

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 361**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012** **E 12773180 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 2761009**

54 Título: **Sistema de ablación transgénica mediada por un vector de virus adenoasociado inducible**

30 Prioridad:

28.09.2011 US 201113247306

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**WILSON, JAMES, M.;
TRETIAKOVA, ANNA, P. y
GREIG, JENNY, AGNES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 559 361 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

Sistema de ablación transgénica mediada por un vector de virus adenoasociado inducible

5 Antecedentes de la invención

La terapia génica implica la introducción de material genético en células hospedadoras con la intención de tratar o curar enfermedades. Muchas enfermedades están causadas por genes "defectuosos" que producen un déficit de una proteína esencial. Una estrategia para corregir la expresión defectuosa de genes es insertar un gen normal (transgén) en un lugar inespecífico dentro del genoma para reemplazar un gen causante de enfermedad, no funcional, o "defectuoso". La terapia génica también puede usarse como una plataforma para la administración de una proteína terapéutica o ARN para tratar diversas enfermedades, de tal manera que el producto terapéutico se exprese durante un periodo de tiempo prolongado, eliminando la necesidad de repetir la dosificación. Para administrar un transgén a las células diana del paciente, ha de usarse una molécula transportadora, denominada vector, siendo el vector más habitual un virus que se ha alterado genéticamente para transportar genes humanos normales. Los virus han evolucionado de tal manera que se encapsulan y sus genes se administran a células humanas de una manera patógena y por tanto, los genomas de los virus pueden manipularse para insertar genes terapéuticos.

La expresión transgénica estable puede realizarse después de la administración *in vivo* de vectores basados en adenovirus o virus adenoasociados (VAA) en células que no se dividen y también mediante trasplante de células madre transducidas *ex vivo* con vectores de integración y no integración, tales como los basados en retrovirus y lentivirus. Los vectores basados en VAA se usan para terapia génica porque, entre otras razones, el VAA no es patógeno, no suscita ninguna respuesta inmunitaria perjudicial y la expresión transgénica del VAA frecuentemente persiste durante años o de por vida en el modelo animal (véase, Shyam et al., Clin. Microbiol. Rev. 24(4):583-593). El VAA es un parvovirus humano pequeño, sin envoltura, que empaqueta una cadena lineal del genoma de ADN monocatenario que tiene 4,7 kb. La infección productiva por VAA se produce únicamente en presencia de un virus auxiliar, bien un adenovirus o un herpes virus. En ausencia de un virus auxiliar, el VAA se integra en un punto específico del genoma del hospedador (19q 13-qter) a alta frecuencia, lo que hace que el VAA sea el único virus de ADN de mamífero conocido, que es capaz de efectuar una integración específica de sitio. Véase, Kotin et al., 1990, PNAS, 87: 221-1-2215. Sin embargo, el VAA recombinante, que no contiene ningún gen de virus y solo un gen terapéutico, no se integra en el genoma. En su lugar el genoma del virus recombinante se fusiona en sus extremos mediante repeticiones terminales invertidas para formar formas circulares, episomales que se espera que sean la causa principal de la expresión génica prolongada (véase Shyam et al., Clin. Microbiol. Rev. 24(4):583-593).

Prácticamente todas las aplicaciones preclínicas y clínicas de la terapia génica han usado vectores que expresan el transgén a partir de un promotor constitutivo, lo que significa que es activo a un nivel fijo durante tanto tiempo como persista el genoma del vector. Sin embargo, muchas enfermedades que pueden tratarse con terapia génica pueden necesitar que tengan regulada la expresión del transgén. Se han descrito diversos sistemas que están basados en el principio general de colocar un gen de interés bajo el control de un factor de transcripción modificado por ingeniería genética inducible por fármacos para inducir positivamente la expresión de genes (Clackson et al., 1997, Curr Opin Chern Biol, 1 (2): 210-8; Rossi et al., Curr Opin Biotechnol, 1998, 9(5): p. 451-6). Los diversos sistemas pueden dividirse en dos clases. En el primero, un dominio de unión a ADN que está alostéricamente regulado por inductores, tales como tetraciclinas, antiprogesterinas y ecdisteroides, está acoplado a un dominio de transactivación. La adición (o en algunos casos la retirada) del fármaco, conduce a la unión del ADN y por tanto a la activación transcripcional. En el segundo, el control alostérico se reemplaza por el mecanismo más general de proximidad inducida. Los dominios de unión a ADN y de activación se expresan como polipéptidos distintos que se reconstituyen en un factor de transcripción activo por la adición de una molécula pequeña bivalente, denominada inductor químico de dimerización o "dimerizador". Aunque estos sistemas son útiles en sistemas de terapia génica que requieren la inducción de la expresión de transgenes, no han abordado la necesidad de poder desactivar o ablacionar permanentemente la expresión transgénica, si esta ya no se requiere o si surge toxicidad debido a la administración prolongada de fármacos.

La técnica anterior desvela medios para la regulación de la expresión de transgenes a partir de vectores basados en VAA. En el documento WO2007/126798, la expresión de un transgén se regula colocándole bajo el control de un elemento inducible, en particular rapamicina o promotores sensibles a rapálogos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a sistemas de terapia génica diseñados para la administración de un producto terapéutico a un sujeto usando una o más composiciones de virus con replicación defectuosa, modificados por ingeniería genética con un mecanismo de seguridad incorporado para ablacionar el producto génico terapéutico, de manera permanente o temporal, en respuesta a un agente farmacológico - preferentemente una formulación oral, por ejemplo, una píldora.

La invención se basa, en parte, en el desarrollo de los solicitantes de una estrategia integrada, denominada en el presente documento "PITA" (*Pharmacologically Induced Transgene Ablation*, ablación transgénica inducida por fármacos) para ablacionar un transgén o regular negativamente la expresión de un transgén. En esta estrategia se usan virus con replicación defectuosa para administrar un transgén que codifica un producto terapéutico (un ARN o una proteína) de manera que se exprese en el sujeto, pero que pueda, de manera reversible o irreversible, desactivarse administrando el agente farmacológico.

La invención presenta muchas ventajas sobre los sistemas en los que la expresión del transgén está regulada positivamente mediante un agente farmacológico. En dichos casos, el receptor debe tomar un compuesto farmacéutico durante el tiempo que necesite para que se exprese el transgén - una duración que puede ser muy prolongada y que puede asociarse con su propia toxicidad.

En un aspecto, la invención proporciona una composición para la administración mediada por VAA de un producto terapéutico tiene un sistema de ablación de expresión transgénica controlado, comprendiendo dicha composición (a) un vector VAA que contiene una molécula de ácido nucleico que comprende: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto terapéutico unido operativamente a un promotor que controla la transcripción; y/o (ii) al menos un sitio de ablación de endonucleasa que comprende una secuencia de al menos 30 pares de bases de ácido nucleico que reconocen específica y selectivamente al menos diez (10X) dedos de cinc, estando localizado dicho al menos un sitio de ablación de endonucleasa al menos en posición 5' con respecto a la secuencia que codifica el producto terapéutico; y (b) al menos un ablacionador que comprende una endonucleasa quimérica que comprende al menos diez copias de un dominio de dedo de cinc ligado a un dominio catalítico de endonucleasa funcional en asociación operativa con un promotor, en la que la actividad de transcripción y/o de ablación se induce en respuesta a un agente farmacológico, reconociendo dicho dominio de al menos diez (10X) dedos de cinc, específica y selectivamente, dicha secuencia de al menos 30 pares de bases en dicho al menos un sitio de ablación de endonucleasa y comprendiendo al menos 10 hélices de reconocimiento seleccionadas independientemente. En una realización, el dominio catalítico de endonucleasa es un dominio catalítico de FokI.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico consiste en una molécula de ADN bicatenaria, en la que al menos un sitio de ablación de endonucleasa está en una primera cadena de la molécula de ADN y al menos un segundo sitio de ablación de nucleasa se localiza en la segunda cadena de la molécula de ADN, en el que dicho segundo sitio de ablación de endonucleasa es distinto de dicho sitio de ablación de endonucleasa en la primera cadena y reconoce, específica y selectivamente, un dedo de cinc diferente.

En un aspecto adicional, el ablacionador (b) está controlado por un casete que está activado por un factor de transcripción después de dimerizarse por un agente farmacológico, comprendiendo dicho casete dos unidades de transcripción, en el que: (c) una de dichas dos unidades de transcripción que codifican el dominio de unión al ADN del factor de transcripción está fusionada con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un primer promotor; y (d) una segunda de dichas dos unidades de transcripción que codifican el dominio de activación del factor de transcripción está fusionada con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un segundo promotor.

En una realización, tanto primer como el segundo promotor, son promotores constitutivos y el agente farmacológico es un dimerizador que dimeriza los dominios del factor de transcripción.

En otra realización, la transcripción del promotor está controlada por un sistema regulable por rapamicina y el agente farmacológico es rapamicina o un rapálogo.

En otra realización adicional, la secuencia de ácido nucleico única de al menos 30 pares de bases de (a) (ii) consta de ácidos nucleicos contiguos que tienen una identidad menor de 70% con cualquier subsecuencia en el genoma humano y de no más de 8 posiciones idénticas contiguas a cualquier subsecuencia en el genoma humano.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tendrán el significado indicado:

"Unidad" se refiere a una unidad de transcripción.

"Unidad transgénica" se refiere a un ADN que comprende (1) una secuencia de ADN que codifica un transgén; (2) un sitio de reconocimiento de ablación (ARS, *ablation recognition site*) incluido en el transgén o flanqueando el mismo; y (3) una secuencia promotora que regula la expresión del transgén.

"Sitio de reconocimiento de ablación" o "ARS" se refiere a una secuencia de ADN que (1) puede reconocer el ablacionador que ablaciona o extirpa el transgén de la unidad transgénica; o (2) codifica una secuencia de ARN de reconocimiento de ablación (ARRS, *ablation recognition RNA sequence*).

"Secuencia de ARN de reconocimiento de ablación" o "ARRS" se refiere a una secuencia de ARN que reconoce el ablacionador que ablaciona el producto de transcripción del transgén o la traducción de su ARNm.

"Ablacionador" se refiere a cualquier producto génico, por ejemplo, un producto traduccional o transcripcional, que reconoce/se une específicamente a cualquiera de (a) el ARS de la unidad transgénica y escinde o extirpa el transgén; o (b) la ARRS de la unidad transgénica transcrita y escinde o impide la traducción del transcrito de ARNm.

"Unidad de ablación" se refiere a un ADN que comprende (1) una secuencia de ADN que codifica un ablacionador; y (2) una secuencia promotora que controla la expresión de dicho ablacionador.

"Unidad de dominio del factor de la transcripción (TF, *transcription factor*) dimerizable" se refiere a (1) una secuencia de ADN que codifica el dominio de unión a ADN de un TF fusionada con el dominio de unión dimerizador (proteína de fusión del dominio de unión a ADN) controlada por un promotor; y (2) una secuencia de ADN que codifica el dominio de activación de un TF fusionada con el dominio de unión dimerizador (proteína de fusión de dominio de activación) controlada por un promotor. En una realización, cada unidad del dominio dimerizable está controlada por un promotor constitutivo y la unidad se utiliza para controlar el promotor para el ablacionador. Como alternativa, uno o más de los promotores puede ser un promotor inducible.

Una "unidad de proteína de fusión dimerizable" se refiere a (1) una primera secuencia de ADN que codifica una unidad, subunidad o fragmento de una proteína o enzima (por ejemplo, un ablacionador) fusionado a un dominio de unión dimerizador y (2) una segunda secuencia de ADN que codifica una unidad, subunidad o fragmento de una proteína o enzima activada, que cuando se expresa y si se requiere, se combina para formar una proteína de fusión. Esta "unidad de proteína de fusión dimerizable" puede utilizarse para diversos propósitos, incluyendo activar un promotor para el ablacionador, proporcionar especificidad al ADN, activar un ablacionador quimérico poniéndose en contacto con el dominio de unión y el dominio catalítico, o para producir un transgén deseado. Estas unidades (1) y (2) pueden estar en una sola fase de lectura abierta separadas mediante un enlazador adecuado (por ejemplo, un IRES o proteína 2A de autoescisión) bajo el control de un solo promotor, o pueden estar en fases de lectura abierta distintas bajo el control de promotores independientes. A partir de la siguiente descripción detallada, será obvio que pueden utilizarse diversas combinaciones de promotores constitutivos o inducibles en los dos componentes de esta unidad, dependiendo del uso para el cual se aplique esta unidad de proteína de fusión (por ejemplo, para la expresión de un ablacionador). En una realización, la unidad de la proteína de fusión dimerizable contiene dominios de unión a ADN que incluyen, por ejemplo, motivos de dedos de cinc, motivos de homeodominio, dominios de caja HMG, proteínas STAT, B3, dominios de hélice-bucle-hélice, hélice alada-giro-hélice, cremallera de leucina, hélice-giro-hélice, hélice alada, POU, dominios de unión a ADN de represores, dominios de unión a ADN de oncogenes y proteínas de unión a ADN específicas de secuencia de origen natural que reconocen más de (>) 6 pares de bases.

"Dimerizador" se refiere a un compuesto o a cualquier fracción que pueda unir dominios de unión heterodimerizables de las proteínas de fusión del dominio TF o proteínas de fusión dimerizables y que induce la dimerización u oligomerización de las proteínas de fusión. Típicamente, el dimerizador se administra a un sujeto como una composición farmacéutica.

"Efecto secundario" se refiere a un efecto secundario no deseable que se produce en un paciente además del efecto terapéutico deseado de un producto transgénico que se proporciona a un paciente mediante la administración de una composición con replicación defectuosa de la invención.

"Virus con replicación defectuosa" o "vector de virus" se refiere a un genoma sintético o artificial que contiene un gen de interés empaquetado en partículas de virus con replicación defectuosa; es decir, partículas que pueden infectar células diana pero que no pueden generar viriones descendientes. El genoma artificial del vector de virus no incluye genes que codifican las enzimas necesarias para replicarse (el genoma puede modificarse con ingeniería genética para que sea un genoma "gutless" (sin entrañas) - que sólo contenga el transgén de interés flanqueado por las señales que son necesarias para la amplificación y empaquetamiento del genoma artificial). Por lo tanto, se considera inocuo para su uso en terapia génica dado que la replicación e infección por viriones descendientes no puede producirse salvo en presencia de la enzima del virus necesaria para la replicación.

"Reservas de virus" o "reservas de virus con replicación defectuosa" se refiere a vectores de virus que empaquetan el mismo genoma artificial/sintético (en otras palabras, una población homogénea o clonal).

Un "ablacionador quimérico modificado por ingeniería genética" o una "enzima quimérica" se proporciona cuando se expresan conjuntamente una secuencia que codifica un dominio catalítico de un ablacionador de endonucleasa fusionada con un dominio de unión y una secuencia que codifica un dominio de unión a ADN de la endonucleasa fusionada con un dominio de unión. La enzima quimérica modificada por ingeniería genética es un dímero, los dominios de unión a ADN pueden seleccionarse, por ejemplo, motivos de dedos de cinc, motivos de homeodominio, dominios de caja HMG, proteínas STAT, B3, dominios de hélice-bucle-hélice, hélice alada-giro-hélice, cremallera de leucina, hélice-giro-hélice, hélice alada, POU, dominios de unión a ADN de represores, dominios de unión a ADN de oncogenes y proteínas de unión a ADN específicas de secuencia de origen natural que reconocen más de (>) 6 pares de bases. [Documento US 5.436.150, expedido el 25 de julio, 1995]. Cuando se forma un heterodímero, los dominios de unión son específicos para un agente farmacológico que induce la dimerización para proporcionar la bioactividad enzimática, la especificidad de unión al ADN y/o la transcripción del ablacionador deseadas. Típicamente, se selecciona una enzima que tenga dominios dobles, es decir, un dominio catalítico y un dominio de unión a ADN que puedan separarse fácilmente. En una realización, se selecciona una endonucleasa de restricción de tipo II. En una realización, se diseña una endonucleasa quimérica basándose en una endonucleasa que tiene dos dominios funcionales, que son independientes de la hidrólisis del ATP. Las nucleasas útiles incluyen endonucleasas de tipo II S, tales como FokI, o una endonucleasa tal como Nae I. Otra endonucleasa adecuada puede seleccionarse de, endonucleasas intrón, tales como, por ejemplo, I-TevI. Incluso otras nucleasas adecuadas incluyen, por ejemplo, integrasas (que catalizan la integración), serina recombinasas (que catalizan la recombinación), tirosina recombinasas, invertasas (por ejemplo, Gin) (que catalizan la inversión), resolvasas (por ejemplo, Tn3) y nucleasas

que catalizan la translocación, resolución, inserción, delección, degradación o intercambio. Sin embargo, pueden seleccionarse otras nucleasas adecuadas.

Breve descripción de los dibujos

Figs. 1A y 1B. Construcción de ADN PITA (*Pharmacologically Induced Transgene Ablation*, ablación transgénica inducida por fármacos), que contiene una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación. La figura 1A es un mapa de la siguiente construcción de ADN, que comprende una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación:

pVAA.CMV.TF.FRB-IRES-1xFKBP.Cre. La Fig. 1B es un dibujo de la unidad de transcripción insertada en la estructura del plásmido. En la Sección 8.1 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Figs. 2A y 2B. Construcción de ADN PITA que contiene una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación. La Fig. 2A es un mapa de la siguiente construcción de ADN, que comprende una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación:

pVAA.CMV.TF.FRB-T2A-2xFKBP.Cre. La Fig. 2B es un dibujo de la unidad de transcripción insertada en la estructura del plásmido. En la Sección 8.1 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Figs. 3A y 3B. Construcción de ADN PITA que contiene una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación. La Fig. 3A es un mapa de la siguiente construcción de ADN, que comprende una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación:

pVAA.CMV173.TF.FRB-T2A-3xFKBP.Cre. La Fig. 3B es un dibujo de la unidad de transcripción insertada en la estructura del plásmido. En la Sección 8.1 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Figs. 4A y 4B. Construcción de ADN PITA que contiene una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación. La Fig. 4A es un mapa de la siguiente construcción de ADN, que comprende una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación:

pVAA.CMV.TF.FRB-T2A-2xFKBP.ISce-I. La Fig. 4B es un dibujo de la unidad de transcripción insertada en la estructura del plásmido. En la Sección 8.1 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Figs. 5A y 5B. Construcción de ADN PITA que contiene una unidad transgénica. La Fig. 5A es un mapa de la siguiente construcción de ADN, que comprende una unidad transgénica:

pENN.CMV.PLloxP.Luc.SV40. La Fig. 5B es un dibujo de la unidad de transcripción insertada en la estructura del plásmido. En la Sección 8.2 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Figs. 6A y 6B. Construcción de ADN PITA que contiene una unidad transgénica. La figura 6A es un mapa de la siguiente construcción de ADN, que comprende una unidad transgénica:

pENN.CMV.PISceI.UC.SV40. La Fig. 6B es un dibujo de la unidad de transcripción insertada en la estructura del plásmido. En la Sección 8.2 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Fig. 7. Construcción de ADN PITA que contiene a una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad transgénica. La figura 7 es un mapa de un vector que contiene una unidad transgénica y una unidad del dominio del factor de transcripción dimerizable. En las Secciones 8.1 y 8.2 del presente documento puede encontrarse una descripción de los diversos dominios de vector.

Figs. 8A-B. Inducción *in vitro* de luciferasa después de tratamiento con rapamicina. La Fig. 8A es un gráfico de barras que muestra la actividad relativa de la luciferasa en células que se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas (construcciones de ADN 1 a 6) 48 horas después de tratarse o no con rapamicina. La Fig. 8B es un gráfico de barras que muestra la actividad relativa de la luciferasa en células que se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas (construcciones de ADN 1 a 6) 72 horas después de tratarse o no con rapamicina.

Figs. 9A-D. En el modelo *in vivo* para un sistema inducible dimerizador, cuatro grupos de ratones recibieron inyección IV de vectores VAA que contenían las siguientes construcciones de ADN. La Fig. 9A es un diagrama de una construcción de ADN que codifica la GFP-luciferasa bajo el control del promotor de CMV constitutivo ubicuo, que se administró a ratones del Grupo 1 mediante vectores VAA. La Fig. 9B es un diagrama de construcciones de ADN que codifican (1) una unidad de dominio del factor de transcripción dimerizable (FRB fusionada con el dominio

de activación p65 y el dominio de unión a ADN ZFHD fusionado con 3 copias de FKBP) que dirige el promotor del CMV; y (2) un vector VAA que expresa la GFP-luciferasa que dirige un promotor inducido por el TF dimerizado, que se administraron a ratones del Grupo 2 mediante vectores VAA. La Fig. 9C es un diagrama de una construcción de ADN que codifica la GFP-Luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo de hígado, TBG, que se administró a ratones del Grupo 3 mediante vectores VAA. La Fig. 9D es un diagrama de construcciones de ADN que codifican (1) un vector VAA que expresa una unidad del dominio de factor de transcripción dimerizable que dirige el promotor TBG; y (2) un vector VAA que expresa la GFP-Luciferasa que dirige un promotor inducido por el TF dimerizado, que se administraron a ratones del Grupo 4 mediante vectores VAA.

Figs. 10A-D. Son imágenes de 4 grupos de ratones que recibieron 3×10^{11} partículas de virus VAA que contenían diversas construcciones de ADN, 30 minutos después de la inyección de luciferina, el sustrato de la luciferasa. La figura 10A muestra la expresión de la luciferasa en diversos tejidos, predominantemente en pulmón, hígado y músculo, en ratones del Grupo 1, antes ("Pre") y después ("Post") de la administración de rapamicina. La figura 10B muestra la expresión de la luciferasa, predominantemente en hígado y músculo en ratones del Grupo 2, antes ("Pre") y después ("Post"), de la administración de rapamicina. La figura 10C muestra la expresión de la luciferasa predominantemente en hígado y músculo después ("Post") de la administración de rapamicina y muestra que la luciferasa no se expresa antes ("Pre") de la administración de rapamicina en ratones del Grupo 3. La figura 10D muestra que la expresión de la luciferasa está limitada al hígado después ("Post") de la administración de rapamicina y muestra que la luciferasa no se expresa antes ("Pre") de la administración de rapamicina.

Figs. 11A-D. Son imágenes de 4 grupos de ratones que recibieron 1×10^{11} partículas de virus VAA que contenían diversas construcciones de ADN, 30 minutos después de la inyección de luciferina, el sustrato de la luciferasa. La figura 11A muestra la expresión de la luciferasa en diversos tejidos, predominantemente en pulmón, hígado y músculo, en ratones del Grupo 1 antes ("Pre") y después ("Post") de la administración de rapamicina. La figura 11B muestra la expresión de la luciferasa, predominantemente en hígado y músculo en ratones del Grupo 2 antes ("Pre") y después ("Post") de la administración de rapamicina. La figura 11C muestra la expresión de la luciferasa predominantemente en hígado y músculo después ("Post") de la administración de rapamicina y muestra que la luciferasa no se expresa antes ("Pre") de la administración de rapamicina en ratones del Grupo 3. La figura 11D muestra que la expresión de la luciferasa está limitada al hígado, administración de rapamicina "Post" y muestra que la luciferasa no se expresa antes ("Pre") de la administración de rapamicina.

Figs. 12A-C. Construcciones de ADN PITA para el tratamiento de AMD. La figura 12A muestra una construcción de ADN que comprende una unidad transgénica que codifica un receptor de VEGF soluble, sFlt-1. La figura 12B muestra una construcción de ADN bicistrónico que comprende una cadena pesada de IgG de Avastín (AvastínH, por *Heavy Chain*) y una cadena ligera de IgG de Avastín (AvastínL, por *Light Chain*) regulada por IRES. La figura 12C muestra una construcción de ADN bicistrónico que comprende una cadena pesada de IgG de Avastín (AvastínH) y una cadena ligera de IgG de Avastín (AvastínL) separadas por una secuencia T2A.

Figs. 13A-B. Construcciones de ADN PITA para el tratamiento de enfermedad metabólica hepática. La figura 13A muestra una construcción de ADN PITA para el tratamiento de la hemofilia A y/o B, que contiene una unidad transgénica que comprende el Factor IX. La figura 13B muestra una construcción de ADN para la administración de ARNhc (de horquilla corta) que se dirige al IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) del VHC (virus de la hepatitis C.)

Figs. 14A-B. Construcciones de ADN PITA para el tratamiento de enfermedad cardíaca. La Fig. 14A muestra una construcción de ADN PITA para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, que contiene una unidad transgénica que comprende factor de crecimiento similar a insulina (IGF1). La Fig. 14B muestra una construcción de ADN PITA para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, que contiene una unidad transgénica que comprende factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

La Fig. 15 es una construcción de ADN PITA para una enfermedad del SNC. La Fig. 15 muestra una construcción de ADN PITA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que contiene una unidad transgénica que comprende factor de crecimiento nervioso (NGF).

Fig. 16. Sistema PITA para tratamiento del VIH. La Fig. 16 muestra una construcción de ADN PITA que contiene una unidad transgénica que comprende las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo del VIH y una construcción de ADN PITA que contiene una unidad de ablación y una unidad de dominio TF dimerizable. La Fig. 16 también muestra que un análogo de la rapamicina (rapálogo) puede inducir la expresión del ablacionador, cre, para ablacionar el transgén (cadenas pesada y ligera de un anticuerpo del VIH) de la construcción de ADN PITA que contiene una unidad transgénica.

Fig. 17. Ilustración de una realización de sistema PITA. La Fig. 17 muestra una unidad transgénica que codifica un anticuerpo terapéutico que está en asociación operativa con un promotor constitutivo, una unidad de ablación que codifica una endonucleasa que está en asociación operativa con un promotor inducible de factores de transcripción y una unidad de dominio TF dimerizable, estando cada secuencia de fusión del dominio del factor de transcripción en asociación operativa con un promotor constitutivo. Antes de la administración de la rapamicina o de un rapálogo, hay una expresión inicial del anticuerpo terapéutico y de las dos proteínas de fusión del dominio del factor de transcripción. Después de la administración de la rapamicina, el factor de transcripción dimerizado induce la expresión de la endonucleasa, lo que escinde el dominio de reconocimiento de endonucleasa en la unidad transgénica, realizando de este modo la ablación de la expresión transgénica.

Las Figs. 18A- 18B son diagramas de barras que ilustran que, cuando un ADN plasmídico contiene un transgén que contiene sitios de ablación para FokI, la expresión ablacionada efectiva de FokI de tipo silvestre de un transgén se cotransfectó en células diana con un plásmido que codifica la enzima FokI. La barra 1 de la Fig. 18A representa 50 ng de pCMV.Luciferasa, la barra 2 representa 50 ng de pCMV.Luciferasa + 200 ng de pCMV.FokI, la barra 3 representa 50 ng de pCMV.Luciferasa + proteína FokI transfectada, la barra 4 representa la proteína FokI transfectada sola; la barra 5 representa controles no transfectados. La barra 1 de la Fig. 18B representa 50 ng de pCMV.Luc en solitario, las barras posteriores representan concentraciones en aumento de un plásmido de expresión ZFHD-FokI (6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng) transfectado conjuntamente con pCMV.Luciferasa. Este estudio se describe en el Ejemplo 11A.

Las Figs. 19A-B son diagramas de barras que ilustran que una enzima quimérica, modificada genéticamente, que está en contacto con un sitio de reconocimiento no afín en el ADN mediante el homeodominio de dedo de cinc, realiza eficazmente la ablación de la expresión de un transgén. La Fig. 19A compara concentraciones en aumento de un plásmido de expresión que codifica la proteína FokI que no está en contacto (6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng y 100 ng) cotransfectada con pCMV.Luciferasa. La primera barra proporciona un control positivo de 50 ng de pCMV.Luc solo. La Fig. 19B compara concentraciones en aumento de un plásmido de expresión que codifica la proteína FokI en contacto con ADN mediante la fusión con el homeodominio de dedo de cinc (6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng y 100 ng) cotransfectada con pCMV.Luciferasa. La primera barra proporciona un control de 50 ng de pCMV.Luc solo. Este estudio se describe en el Ejemplo 11 B.

Las Figs. 20A-B son diagramas de barras que ilustran que la especificidad de unión del ADN de la proteína FokI quimérica puede cambiarse de manera reproducible por fusión con diversas clases de dominios de unión a ADN heterólogo y la ablación del transgén diana puede mejorarse adicionalmente por la adición de una señal de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) heteróloga. La Fig. 20A ilustra los resultados de la cotransfección de pCMV.Luciferasa con concentraciones en aumento de un plásmido de expresión que codifica la proteína FokI en contacto con ADN mediante una fusión con el dominio HTH (hélice-giro-hélice, *helix-turn-helix*) (6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng). La primera barra es un control que muestra 50 ng de pCMV.Luciferasa sólo. La Fig. 20B ilustra los resultados de la cotransfección de pCMV.Luciferasa con concentraciones en aumento de un plásmido de expresión que codifica una fusión de HTH-FokI, que adicionalmente tiene una señal de localización nuclear (NLS) en su extremo N (6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng). La primera barra es un control que muestra 50 ng de pCMV.Luciferasa sólo. Este estudio se describe en el Ejemplo 11C.

La Fig. 21 es un diagrama de flujo de un método para seleccionar una secuencia de ácido nucleico única para su uso en un sitio de reconocimiento de ablación como se describe en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a sistemas de terapia génica diseñados para administrar un producto farmacéutico a un sujeto usando una o más composiciones de virus con replicación defectuosa, modificadas por ingeniería genética con un mecanismo de seguridad incorporado para la ablación del producto génico terapéutico, de manera permanente o temporal, en respuesta a un agente farmacológico - preferentemente una formulación oral, por ejemplo, una píldora.

En el sistema PITA, se usan uno o más virus con replicación defectuosa en una composición de virus con replicación defectuosa, en el que uno o más genomas virales se han modificado por ingeniería genética para que contengan: (a) una primera unidad de transcripción que codifica un producto terapéutico en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha unidad al menos un sitio de reconocimiento de ablación; y (b) una segunda unidad de transcripción que codifica un ablacionador (o un fragmento del mismo como parte de una unidad de proteína de fusión) específico para el sitio de reconocimiento de ablación en asociación operativa con un promotor que induce la transcripción en respuesta a un agente farmacológico. Puede usarse cualquier agente farmacológico que dimerize específicamente los dominios del dominio de unión seleccionado. En una realización, puede usarse rapamicina y sus análogos denominados "rapálogos".

Un genoma de virus que contiene una primera unidad de transcripción puede contener dos o más sitios de reconocimiento de ablación iguales o dos o más sitios de reconocimiento de ablación diferentes, (es decir, que son sitios específicos para un ablacionador diferente en comparación con el que reconoce el otro sitio (o sitios) de reconocimiento de ablación). Ya sean iguales o diferentes, dichos dos o más sitios de reconocimiento de ablación pueden localizarse en tándem entre sí, o pueden localizarse en una posición no contigua entre sí. Además, el sitio (o sitios) de reconocimiento de ablación puede localizarse en cualquier posición con respecto a la secuencia codificante para el transgén, es decir, dentro de la secuencia que codifica el transgén, en posición 5' con respecto a la secuencia codificante (bien inmediatamente en posición 5' o separado por una o más bases, por ejemplo, aguas arriba o aguas abajo del promotor) o en posición 3' con respecto a la secuencia codificante (por ejemplo, bien inmediatamente en posición 3' o separado por una o más bases, por ejemplo, aguas arriba de la secuencia poli A).

Un ablacionador es cualquier producto génico, por ejemplo, un producto traduccional o transcripcional; que reconoce/se une específicamente a cualquiera de (a) uno o más sitios de reconocimiento de ablación (ARS) de la unidad transgénica y escinde o extirpa el transgén; o (b) la secuencia de ARN de reconocimiento de ablación (ARRS) de la unidad transgénica transcrita y escinde o inhibe la traducción del transcrito de ARNm. De la manera en la que se describe en el presente documento, un ablacionador puede seleccionarse del grupo que consiste en: una

endonucleasa, una recombinasa, una meganucleasa, o una endonucleasa de dedo de cinc que se une al sitio de reconocimiento de ablación en la primera unidad de transcripción y extirpa o ablaciona el ADN y un ARN de interferencia, una ribozima o una cadena antisentido que ablaciona el transcrito de ARN de la primera unidad de transcripción, o suprime la traducción del transcrito de ARN de la primera unidad de transcripción. En una realización específica, el ablacionador es Cre (que tiene loxP como su sitio de reconocimiento de ablación), o el ablacionador es FLP (que tiene FRT como su sitio de reconocimiento de ablación). En una realización, se selecciona una endonucleasa que actúa independientemente de la hidrólisis del ATP. Los ejemplos de dichos ablacionadores pueden incluir una endonucleasa de tipo II S (por ejemplo, FokI), NaeI y endonucleasas intrón (tales como, por ejemplo, I-TevI), integrasas (que catalizan la integración), serina recombinasas (que catalizan la recombinación), tirosina recombinasas, invertasas (por ejemplo Gin) (que catalizan la inversión), resolvasas, (por ejemplo, Tn3) y nucleasas que catalizan la translocación, resolución, inserción, delección, degradación o intercambio. Sin embargo, pueden seleccionarse otras nucleasas adecuadas.

Para la inhabilitación permanente del transgén terapéutico, el ablacionador puede ser una endonucleasa que se una a uno o más sitios de reconocimiento de ablación en la primera unidad de transcripción y ablaciona o extirpa el transgén. Cuando se desea realizar la inhabilitación temporal del transgén, debe seleccionarse un ablacionador que se una a uno o más sitios de reconocimiento de ablación en el transcrito de ARN del transgén terapéutico y ablacione el transcrito, o inhiba su traducción. En este caso, pueden usarse los ARN de interferencia, ribozimas o sistemas antisentido. El sistema es particularmente deseable si el transgén terapéutico se administra para tratar el cáncer, una diversidad de enfermedades genéticas que serán fácilmente obvias para un experto en la técnica, o realizar la mediación de una respuesta inmunitaria del hospedador.

La expresión del ablacionador puede controlarse mediante uno o más elementos, incluyendo, por ejemplo, un promotor inducible y/o usando un ablacionador quimérico que utilice un sistema de proteína de fusión homodimérica o heterodimérica, tal como se describe en el presente documento. Cuando se selecciona el uso de un sistema homodimérico, la expresión del ablacionador se controla mediante un promotor inducible. Cuando se selecciona el uso de un sistema heterodimérico, la expresión del ablacionador se controla mediante la adición de un agente farmacológico y opcionalmente, un promotor inducible adicional para una o las dos proteínas de fusión que forman el sistema heterodimérico. En una realización se selecciona un ablacionador homo- y hetero- dimerizable para proporcionar una capa adicional para asegurar las construcciones con reguladores de factores de transcripción. Estos sistemas se describen con más detalle más adelante en esta memoria descriptiva.

De acuerdo con la divulgación hecha, puede usarse cualquiera de los virus adecuados para terapia génica, incluyendo pero sin limitación virus adenoasociados ("VAA"); adenovirus; herpesvirus; lentivirus; retrovirus; etc. En la presente invención, el virus con replicación defectuosa que se usa es un virus adenoasociado ("VAA"). Siendo particularmente atractivos para su uso en sujetos humanos el VAA1, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9 o rh10. Debido a limitaciones de tamaño del genoma de los VAA para el empaquetamiento, las unidades de transcripción pueden modificarse por ingeniería genética y empaquetarse en dos o más reservas de VAA. Tanto si se empaqueta en una reserva viral que se usa como una composición de virus de acuerdo con la invención, o en dos o más reservas de virus que forman una composición de virus de la invención, el genoma viral usado para el tratamiento debe contener en su conjunto la primera y segunda unidades de transcripción que codifican el transgén terapéutico y el ablacionador; y puede comprender además unidades de transcripción adicionales. Por ejemplo, la primera unidad de transcripción puede empaquetarse en una reserva viral y la segunda, tercera y cuarta unidad de transcripción empaquetarse en una segunda reserva viral. Como alternativa, la segunda unidad de transcripción puede empaquetarse en una reserva viral y la primera, tercera y cuarta unidades de transcripción empaquetarse en una segunda reserva viral. Aunque resulte útil para el VAA debido a las limitaciones de tamaño en el empaquetamiento del genoma del VAA, pueden usarse otros virus para preparar una composición de virus, composiciones virales de la divulgación, en las que estas contienen virus múltiples, que pueden contener diferentes virus con replicación defectuosa (por ejemplo, VAA y adenovirus).

En una realización, una composición de virus de acuerdo con la invención contiene dos o más reservas de VAA diferentes (u otras reservas de virus), en dichas combinaciones como se describe anteriormente. Por ejemplo, una composición de virus puede contener una primera reserva viral que comprende el gen terapéutico con sitios de reconocimiento del ablacionador y un primer ablacionador y una segunda reserva viral que contenga uno más ablacionadores adicionales. Otra composición de virus puede contener una primera reserva de virus que comprenda un gen terapéutico y un fragmento de un ablacionador y una segunda reserva de virus que comprenda otro fragmento de un ablacionador. A partir de la descripción de los componentes del sistema presente se apreciarán diversas otras combinaciones de dos o más reservas de virus en una composición de virus de la invención.

En una realización, una composición contiene uno o más vectores VAA en un sistema para administrar un producto farmacéutico que tiene un sistema de ablación de expresión transgénica controlada. Al menos un vector VAA en la composición contiene una molécula de ácido nucleico que comprende: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto terapéutico unido operativamente a un promotor que controla la transcripción; y (ii) al menos un sitio de ablación de endonucleasa que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 30 pares de bases que reconocen de manera específica y selectiva al menos diez (10X) dedos de cinc, estando dicho al menos un sitio de ablación endonucleasa localizado al menos en posición 5' con respecto a la secuencia que codifica el producto

terapéutico; y (b) al menos un ablacionador que comprende una endonucleasa quimérica que comprende al menos diez copias de un dominio de dedo de cinc ligado a un dominio catalítico de endonucleasa funcional en asociación operativa con un promotor, en el que la actividad de transcripción y/o ablación se induce en respuesta a un agente farmacológico, reconociendo dicho dominio de al menos diez (10X) dedos de cinc, de manera específica y selectiva, dicha secuencia de al menos 30 pares de bases en dicho al menos un sitio de ablación de endonucleasa y comprendiendo al menos 10 hélices de reconocimiento seleccionadas independientemente. En una realización, el dominio catalítico de endonucleasa en un dominio catalítico de FokI. En una realización adicional, el ablacionador (b) está controlado por un casete que se activa por un factor de transcripción después de dimerizarse con por un agente farmacológico, comprendiendo dicho casete dos unidades de transcripción, en el que una de dichas dos unidades de transcripción que codifican el dominio de unión a ADN del factor de transcripción se fusiona con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un primer promotor; y una segunda de dichas dos unidades de transcripción que codifican el dominio de activación del factor de transcripción se fusiona con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un segundo promotor. Puede usarse cualquier agente farmacológico que dimerice específicamente los dominios del dominio de unión seleccionado. En una realización, pueden usarse rapamicina y sus análogos denominados "rapálogos".

Para conservar espacio dentro del genoma (o genomas) viral, pueden modificarse unidades de transcripción bicistrónicas mediante ingeniería genética. Por ejemplo, las unidades de transcripción que pueden regularse por el mismo promotor, por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción (y cuando sea aplicable, la primera unidad de transcripción que codifica el transgén terapéutico) pueden modificarse por ingeniería genética como una unidad bicistrónica que contiene un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) o un péptido 2A, que se autoescinde en un acontecimiento postraducciona (por ejemplo, furina -2A) y que permite la expresión conjunta de productos génicos heterólogos mediante un mensaje a partir de un solo promotor cuando el transgén (o una secuencia que codifica un ablacionador) es grande, consta de subunidades múltiples, o dos transgenes se administran conjuntamente, portando el VAA recombinante (VAAr) el transgén (o transgenes) o las subunidades se administran conjuntamente para permitir su concatimerización *in vivo* para formar un genoma de un solo vector. En dicha realización, un primer VAA puede llevar un casete de expresión que exprese un solo transgén y un segundo VAA puede llevar un casete de expresión que exprese un transgén diferente para la expresión conjunta en la célula hospedadora. Sin embargo, el transgén seleccionado puede codificar cualquier producto biológicamente activo u otro producto, por ejemplo, un producto deseable para el estudio. Un solo promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contenga, en una sola fase de lectura abierta (ORF, *open reading frame*), dos o tres genes heterólogos (por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción y cuando sea aplicable, la primera unidad de transcripción que codifica el transgén terapéutico) separados entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (por ejemplo, el péptido 2A, T2A) o un sitio de reconocimiento de proteasas (por ejemplo, furina). Por tanto la ORF codifica una sola poliproteína, que, bien durante la traducción (en el caso de T2A) o después de la misma, se escinde en proteínas individuales. Estos IRES y sistemas poliproteína pueden usarse para ahorrar espacio en el empaquetamiento del VAA, estos solamente pueden usarse para la expresión de componentes que pueden estar dirigidos por el mismo promotor.

La invención también se refiere a construcciones de ADN usadas para modificar por ingeniería genética líneas celulares para la producción de composiciones de virus con replicación defectuosa; a métodos para producir y fabricar las composiciones de virus defectuosas en replicación; a la expresión en diversos tipos de células y sistemas, incluyendo células de plantas, bacterias, mamíferos, etc. También se desvelan métodos de tratamiento que utilizan composiciones de virus con replicación defectuosa para la transferencia génica, incluyendo el tratamiento veterinario (por ejemplo, en ganado y otros mamíferos) y para la terapia *in vivo* o *ex vivo*, incluyendo terapia génica en sujetos humanos.

5.1. Sistema de ablación transgénica

La presente invención proporciona un sistema de ablación transgénica Inducida por fármacos (PITA, del inglés *Pharmacologically Induced Transgene Ablation System*) diseñado para la administración de un transgén (que codifica un producto - proteína o ARN terapéutico) usando composiciones de virus con replicación defectuosa, modificados por ingeniería genética con un mecanismo de seguridad integrado para la ablación del producto génico terapéutico, bien de modo permanente o temporal, en respuesta a un agente farmacológico - preferentemente una formulación oral, por ejemplo, una píldora que contiene una molécula pequeña que induce la expresión del ablacionador específico para el transgén o su producto de transcripción. Sin embargo, pueden seleccionarse otras vías de administración para el agente farmacológico.

En el sistema PITA, se usan uno o más virus con replicación defectuosa en los que el genoma (o genomas) del virus se ha modificado por ingeniería genética para que contenga una unidad transgénica (descrita en la Sección 5.1.1 del presente documento) y una unidad de ablación (descrita en la Sección 5.1.2 del presente documento). En particular, se usan uno o más virus con replicación defectuosa en los que el genoma (o genomas) del virus se ha modificado por ingeniería genética para que contenga (a) una primera unidad de transcripción que codifica un producto terapéutico en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha unidad al menos un sitio de reconocimiento de ablación (una unidad transgénica); y (b) una segunda unidad de transcripción

que codifica un ablacionador específico para el sitio de reconocimiento de ablación en asociación operativa con un promotor que induce la transcripción de respuesta a un agente farmacológico (una unidad de ablación).

En una realización, el sistema PITA se diseña de tal manera que el genoma (o genomas) viral de los virus con replicación defectuosa se modifican también por ingeniería genética para que contengan una unidad de dominio dimerizable (descrita en la Sección 5.1.3). En una realización, administrando una unidad de dominio TF dimerizable, las células diana se modifican para expresar conjuntamente dos proteínas de fusión: una que contiene un dominio de unión a ADN (DBD, del inglés *DNA-binding domain*) del factor de transcripción que une el promotor inducible que controla el ablacionador y la otra que contiene un dominio de activación (AD, *activation domain*) transcripcional del factor de transcripción que activa el promotor inducible que controla el ablacionador, cada una de ellas fusionada para dimerizar dominios de unión (descritos en la Sección 5.1.3). La adición de un agente farmacológico, o "dimerizador" (descrito en la Sección 5.1.4) que puede interaccionar simultáneamente con los dominios de unión dimerizadores presentes en ambas proteínas de fusión, produce el reclutamiento de la proteína de fusión AD al promotor regulado, iniciando la transcripción del ablacionador. Véase, por ejemplo, el sistema ARGENT® descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.834.266 y en la patente de Estados Unidos n.º 7.109.317, cada una de ellas incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad. Utilizando dominios de unión dimerizadores que no tienen afinidad entre sí en ausencia de ligando y un promotor mínimo apropiado, la transcripción se realiza absolutamente dependiente de la adición del dimerizador.

Para esta finalidad, el genoma (o genomas) viral de los virus con replicación defectuosa puede modificarse adicionalmente por ingeniería genética para que contenga una tercera y una cuarta unidad de transcripción (una unidad de dominio TF dimerizable), cada una de ellas codificando un dominio dimerizable de un factor de transcripción que regula al promotor inducible del ablacionador en la segunda unidad de transcripción, en la cual: (c) la tercera unidad de transcripción codifica el dominio de unión a ADN del factor de transcripción fusionado a un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un promotor constitutivo; y (d) la cuarta unidad de transcripción codifica el dominio de activación del factor de transcripción fusionado a un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un promotor. En una realización, cada componente del dominio TF dimerizable se expresa bajo un promotor constitutivo. En otra realización, al menos un componente de la unidad del dominio TF dimerizable se expresa bajo un promotor inducible.

En la Figura 24 se ilustra una realización del sistema PITA, que muestra una unidad transgénica que codifica un anticuerpo terapéutico que está en asociación operativa con un promotor constitutivo, una unidad de ablación que codifica una endonucleasa que está en asociación operativa con un promotor inducible por el factor de transcripción y una unidad de dominio TF dimerizable, cada una de ellas con una secuencia de fusión del dominio del factor de transcripción en asociación operativa con un promotor constitutivo. Antes de la administración de rapamicina o un rapálogo, hay una expresión inicial del anticuerpo terapéutico y de las dos proteínas de fusión de dominio del factor de transcripción. Después de la administración de rapamicina, el factor de transcripción dimerizado induce la expresión de la endonucleasa, que escinde el dominio de reconocimiento endonucleasa en la unidad transgénica, realizando de este modo la ablación de la expresión transgénica.

En la invención, el virus con replicación defectuosa que se usa en el sistema PITA es un virus adenoasociado ("VAA") (descrito en la Sección 5.1.5). Siendo más particularmente atractivos VAA1, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9 o rh10 para su uso en sujetos humanos. Debido a limitaciones de tamaño del genoma del VAA para el empaquetamiento, las unidades de transcripción pueden modificarse por ingeniería genética y empaquetarse en dos o más reservas VAA. Por ejemplo, la primera unidad de transcripción puede empaquetarse en una reserva VAA y la segunda, tercera y cuarta unidades de transcripción pueden empaquetarse en una segunda reserva VAA. Como alternativa, la segunda unidad de transcripción pueden empaquetarse en una reserva VAA y la primera, tercera y cuarta unidades de transcripción pueden empaquetarse en una segunda reserva VAA.

5.1.1. Unidad transgénica

En el sistema PITA, se usan uno o más virus con replicación defectuosa en los que el genoma (o genomas) viral se ha modificado por ingeniería genética para que contenga una unidad transgénica. De la manera en la que se usa en el presente documento, la expresión "unidad transgénica" se refiere a un ADN que comprende: (1) una secuencia de ADN que codifica un transgén; (2) al menos un sitio de reconocimiento de ablación (ARS) contenido en una localización que altera la expresión transgénica, incluyendo, dentro o flanqueando el transgén o sus elementos de control de expresión (por ejemplo, aguas arriba o aguas abajo del promotor y/o aguas arriba de la señal poliA); y (3) una secuencia promotora que regula la expresión del transgén. El ADN que codifica el transgén puede ser ADN genómico, ADNc o un ADNc que incluya uno o más intrones que pueden, por ejemplo, potenciar la expresión del transgén. En sistemas diseñados para retirar el transgén, el sitio de reconocimiento de ablación (ARS) que se usa es uno que reconoce el ablacionador (descrito en la Sección 5. 1. 2) que ablaciona o extirpa el transgén, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endonucleasas incluyendo, pero sin limitación, una recombinasa (por ejemplo, el sistema Cre/loxP, el sistema FLP/FRT), una meganucleasa (por ejemplo, el sistema I-SceI), un sistema artificial de enzimas de restricción u otro sistema artificial de enzimas de restricción, tal como la nucleasa de dedo de cinc, o una enzima de restricción específica de un sitio de restricción que raramente se produce en el genoma humano y similar. Para reprimir la expresión del transgén, el ARS puede codificar una secuencia de ARN de reconocimiento de

ablación (ARRS, *ablation recognition RNA sequence*), es decir, una secuencia de ARN que reconoce el ablacionador que ablaciona el producto de transcripción del transgén o la traducción de su ARNm, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de ribozima, una secuencia de reconocimiento de ARNi, o una secuencia de reconocimiento antisentido.

Como ejemplos de transgenes que pueden modificarse por ingeniería genética en las unidades transgénicas de la presente invención se incluyen, pero sin limitación, un transgén que codifica: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que neutraliza la infectividad del VIH, un anticuerpo terapéutico, tal como el anticuerpo VEGF, anticuerpo TNF- α (por ejemplo, infliximab, adalimumab), un anticuerpo EGF-R, basiliximab, cetuximab, infliximab, rituxumab, alemtuzumab-CLL, daclizumab, efalizumab, omalizumab, pavilizumab, trastuzumab, gemtuzumab, adalimumab, o un fragmento de anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos terapéuticos anteriores; receptor-1 del factor de crecimiento endotelial vascular soluble (sFlt-1), receptor e TNF- α soluble (por ejemplo, etanercept), factor VIII, factor IX, insulina, factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (RGF), hemo oxigenasa-1 (RO-1), factor de crecimiento nervioso (NGF), beta-IFN, IL-6, anticuerpo anti-EGFR, interferón (IFN), IFN beta-1 α , un anticuerpo anti-CD20, péptido-1 similar a glucagón (GLP-1), molécula de adhesión anti-celular, anticuerpo α 4-integrina, factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), descarboxilasa L- aminoácídica aromática (ADCC), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), galanina, neuropéptido Y (NPY), un antagonista de TNF, quimiocinas de la familia IL-8, BCL2, IL-10, un ARNi terapéutico, una proteína u6 terapéutica, endostatina, plasminógeno o un fragmento de los mismos, TIMP3, VEGF-A, RIFI alfa, PEDF, o antagonista del receptor de IL-1.

El transgén puede estar bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, o un promotor regulado por señales fisiológicas.

Los ejemplos de promotores constitutivos adecuados para el control de la expresión de los productos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, el promotor del citomegalovirus (CMV) humano, los promotores temprano y tardío del virus de simio 40 (SV40), el promotor de U6, los promotores de metalotioneína; el promotor de EF1a, el promotor de ubiquitina, el promotor de hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), el promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR) (Scharfmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4626-4630 (1991), el promotor de adenosín desaminasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK), el promotor de piruvato quinasa, el promotor de fosfoglicerol mutasa, el promotor de β - actina (Lai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10006-10010 (1989)), las repeticiones terminales largas (LTR, *long terminal repeats*) del virus de la leucemia de Moloney y de otros retrovirus, el promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple y otros promotores constitutivos que conocen los expertos en la técnica.

Los promotores inducibles, adecuados para controlar la expresión del producto terapéutico incluyen promotores sensibles a agentes exógenos (por ejemplo, agentes farmacológicos) o a señales fisiológicas. Estos elementos de respuesta incluyen, pero sin limitación, un elemento de respuesta a hipoxia (HRE, *hypoxia response element*) que une a HIF-1 α y un elemento de respuesta a tetraciclina (como describen Gossen y Bujard (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551); un elemento de respuesta inducible por ecdisona (No D et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 3346-3351) un elemento de respuesta a iones metálicos como describen Mayo et al. (1982, Cell 29: 99-108); Brinster et al. (1982, Nature 296: 39-42) y Searle et al. (1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1480-1489); un elemento de respuesta al choque térmico como describen Nouer et al. (en: Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., ppl67-220, 1991); o un elemento de respuesta a hormonas como describen Lee et al. (1981, Nature 294: 228-232); Hynes et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2038-2042, 1981); Klock et al. (Nature 329: 734-736, 1987); e Israel y Kaufman (1989, Nucl. Acids Res. 17: 2589-2604) y otros promotores inducibles conocidos en la técnica. Preferentemente el elemento de respuesta es un elemento de respuesta inducible por ecdisona, más preferentemente el elemento de respuesta es un elemento de respuesta a tetraciclina.

Los ejemplos de promotores específicos de tejido adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los enumerados en la Tabla 1 y otros promotores específicos de tejido conocidos en la técnica.

Tabla 1: promotores específicos de tejido

Tejido	Promotor
Hígado	TBG, 1AT
Corazón	Troponina T (TnT)
Pulmón	CC10, SPC, FoxJ1
Sistema nervioso central/cerebro	Sinapsina, Tirosina Hidroxilasa, CaMKII (Ca ²⁺ / proteína quinasa dependiente de calmodulina)
Páncreas	Insulina, Elastasa-I
Adipocitos	Ap2, Adiponectina
Músculo	Desmina, MHC
Células endoteliales	Endotelina-I (ET -I), Flt-I

Retina	VMD

Por ejemplo, y no como limitación, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención pueden usarse para administrar un antagonista de VEGF para el tratamiento de la degeneración macular acelerada en un sujeto humano; el factor VIII para tratar la hemofilia A en un sujeto humano; el Factor IX para tratar la hemofilia B en un sujeto humano; el factor de crecimiento insulínico (IGF) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto humano; el factor de crecimiento nervioso (NGF) para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central en un sujeto humano; o un anticuerpo neutralizante contra el VIH para el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto humano.

Otros productos terapéuticos adicionales que son útiles incluyen hormonas y factores de crecimiento y de diferenciación, incluyendo, sin limitación, insulina, glucagón, hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF), hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores I y II de crecimiento de insulina (IGF-I y IGF-II), uno cualquiera de la familia de factores de crecimiento transformante de la superfamilia α , incluyendo TGF α , activinas, inhibinas, o cualquiera de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) BMP 1-15, uno cualquiera de la familia de factores de crecimiento herregulina/neuregulina/ARIA/factor de diferenciación neu (NDF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), neurturina, agrina, uno cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, erizo sónico y tirosina hidroxilasa.

Otros productos transgénicos útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario incluyendo, sin limitación, citocinas y linfocinas tales como trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-25 (incluyendo, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-12 e IL-18), proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores α y β de necrosis tumoral, interferón α , β , y γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T quiméricos, receptores de linfocitos T monocatenarios, moléculas de MHC de clase I y II, así como inmunoglobulinas y moléculas de MHC modificadas por ingeniería genética. Los productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras del complemento tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de la descomposición (DAF), CR1, CF2 y CD59.

Otros productos transgénicos adicionales útiles incluyen uno cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La invención incluye receptores para la regulación de colesterol y/o modulación de lípidos, incluyendo el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), el receptor de lipoproteína de alta densidad (HDL), el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y receptores eliminadores. La invención también incluye productos génicos tal como miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas, incluyendo receptores de glucocorticoides y receptores de estrógenos, receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Además, los productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tales como *jun*, *fos*, *max*, *mad*, factor de respuesta a suero (SRF), AP-1, AP2, *myb*, MyoD y miogenina, proteínas que contienen la caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de unión a la caja CCAAT, factor de regulación de interferón (IRF-1), proteína de tumor de Wilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a la caja GATA, por ejemplo, GATA-3, y la familia con cabeza de tenedor (*forkhead*) de proteínas de hélice aladas.

Otros productos génicos útiles incluyen, carbamoil sintetasa I, ornitin transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumaril acetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinogen desaminasa, cistatión beta-sintasa, descarboxilasa cetoácida de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA dehidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilato, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), y un producto génico de distrofina [por ejemplo, una mini- o micro-distrofina]. Incluso otros productos génicos útiles incluyen enzimas, tales como las que pueden ser útiles en la terapia de reemplazo enzimático, que son útiles en diversas afecciones resultantes de la actividad deficitaria de las enzimas. Por ejemplo, enzimas que contienen manosa-6-fosfato pueden utilizarse en terapias para enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, un gen adecuado incluye el que codifica la β -glucuronidasa (GUSB)).

5.1.2. Unidad de ablación

El genoma (o genomas) viral de uno o más virus con replicación defectuosa usados en el sistema PITA se modifican por ingeniería genética para que adicionalmente contengan una unidad de ablación o secuencias que codifiquen un ablacionador, de la manera en la que se define en el presente documento.

Para la inhabilitación permanente de la expresión transgénica, el ablacionador puede ser una endonucleasa, incluyendo, pero sin limitación, una recombinasa, una meganucleasa, una endonucleasa de dedo de cinc o cualquier enzima de restricción con un sitio de restricción que rara vez se produce en el genoma humano, que se une al ARS de la unidad transgénica y ablaciona o extirpa el transgén. Como ejemplos de dichos ablacionadores se incluyen, pero sin limitación, el sistema Cre/loxP (Gogh et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,5995-6000); el sistema FLP/FRT (Sorrell et al., 2005, Biotechnol. Adv. 23, 431-469); meganucleasas tal como I-SceI que reconoce un elemento específico asimétrico de 18 pb (T AGGGAT AACAGGGT AAT (SEC ID N°: 25)), una secuencia poco habitual en el genoma de mamíferos, y que crea roturas bicatenarias (Jasin, M., 1996, Trends Genet., 12, 224-228); enzimas de restricción artificiales (por ejemplo, una nucleasa de dedo de cinc generada por fusión de un dominio de unión a ADN de dedo de cinc con un dominio de escisión de ADN que puede modificarse por ingeniería genética para dirigir secuencias ARS únicas en el genoma de mamífero (Miller et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 5809-5814)). En una realización, el ablacionador es una enzima quimérica, que puede estar basada en una proteína de fusión homodimérica o heterodimérica.

Cuando se desea la inhabilitación temporal del transgén, puede seleccionarse un ablacionador que se una a la ARRS del transcrito de ARN de la unidad transgénica y realice la ablación de transcrito o inhiba su traducción. Los ejemplos de dichos ablacionadores incluyen, pero sin limitación, los ARN de interferencia (ARNi), ribozimas tales como ribo-interruptores" (del inglés, *riboswitches*) (Bayer et al., 2005, Nat Biotechnol. 23(3): 337-43), u oligonucleótidos antisentido que reconocen una ARRS. Usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica pueden diseñarse y construirse ARNi, ribozimas y oligonucleótidos antisentido que reconozcan una ARRS. Este sistema se desea particularmente si el transgén terapéutico se administra para tratar el cáncer o para realizar la mediación de una respuesta inmunitaria del hospedador.

En una realización, la expresión del ablacionador debe controlarse por un promotor inducible que proporciona un control estricto sobre la transcripción del gen ablacionador, por ejemplo, un agente farmacológico, o factores de transcripción activados por un agente farmacológico o en realizaciones alternativas, señales fisiológicas. Se prefieren sistemas promotores herméticos y que se controlen estrictamente. Los promotores inducibles adecuados para el control de la expresión del ablacionador son, por ejemplo, elementos de respuesta, incluyendo, pero sin limitación, un elemento de respuesta a tetraciclina (tet) (tal como describen Gossen y Bujard (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551); un elemento de respuesta inducible por ecdisona (No D et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 3346-3351) un elemento de respuesta a iones metálicos como describen Mayo et al. (1982, Cell. 29: 99-108); Brinster et al. (1982, Nature 296: 39-42) y Searle et al. (1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1480-1489); un elemento de respuesta al choque térmico tal como describen Nouer et al. (en: Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., pp167-220, 1991); o un elemento de respuesta a hormonas como describen Lee et al. (1981, Nature 294: 228-232); Hynes et al. (1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2038-2042); Klock et al. (1987, Nature 329: 734-736); e Israel & Kaufman (1989, Nucl. Acids Res. 17: 2589-2604) y otros promotores inducibles conocidos en la técnica. Usando dichos promotores, la expresión del ablacionador puede controlarse, por ejemplo mediante el sistema Tet-activado/desactivado (Gossen et al., 1995, Science 268: 1766-9; Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89 (12): 5547-51); el sistema TetR-KRAB (Urrutia R., 2003, Genome Bioi., 4 (10): 231; Deuschle U et al., 1995, Mol Cell Biol. (4): 1907-14); el sistema regulable por mifepristona (RU486) (Geneswitch; Wang Y et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91 (17): 8180-4; Schillinger et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102 (39): 13789-94); el sistema regulable por tamoxifeno-dep humanizado (Roscelli et al., 2002, Mol. Ther. 6 (5): 653-63); y el sistema regulable por ecdisona-dep (Rheoswitch; Karns et al., 2001, BMC Biotechnol. 1: 11; Palli et al., 2003, Eur J Biochem. 270 (6): -15) por nombrar algunos.

Un promotor constitutivo o inducible puede controlar una enzima quimérica. En una realización, el sistema utiliza una endonucleasa quimérica, en el que la nucleasa tiene al menos dos dominios, es decir, un dominio catalítico y una secuencia de dominio de unión a ADN específica, expresándose cada uno de ellos bajo promotores controlados independientemente y que están unidos operativamente. Cuando se expresan los dos dominios al mismo tiempo, los productos de los dos dominios forman una endonucleasa quimérica. Típicamente, se proporcionan unidades de transcripción distintas conteniendo cada una de ellas dominios unidos a un dominio de unión a ADN. Dichos dominios de unión a ADN incluyen, por ejemplo, motivos de dedos de cinc, motivos de homeodominio, dominios de caja HMG, proteínas STAT, B3, dominios de hélice-bucle-hélice, hélice alada-giro-hélice, cremallera de leucina, hélice-giro-hélice, hélice alada, POU, dominios de unión a ADN de represores, dominios de unión a ADN de oncogenes y proteínas de unión a ADN específicas de secuencia de origen natural que reconocen más de 6 pares de bases. [Documento US 5.436.150, expedido el 25 de julio de 1995].

En una realización, la expresión del ablacionador está bajo el control de un promotor inducible que está regulado por los dominios de factor de transcripción dimerizables descritos en la Sección 5.1.3. Un ejemplo de dicho promotor inducible incluye, pero sin limitación, un promotor mínimo del sitio de unión a GAL4, que es sensible a un factor de transcripción de GAL4. Un dominio de unión de ADN DE GAL4 o dominio de transactivación también puede fusionarse con un receptor esteroideo, tal como el receptor de ecdisona (EcR). Pueden seleccionarse incluso otros promotores inducibles adecuados, tales como los descritos en el presente documento.

5.1.3. Unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable

En una realización, el sistema PITA se diseña de tal manera que el genoma (o genomas) viral de los virus con replicación defectuosa se modifican adicionalmente por ingeniería genética para que contengan unidades dimerizables que son proteínas de fusión heterodiméricas. Estas unidades pueden ser una unidad TF dimerizable como se define en el presente documento u otra unidad de proteína de fusión dimerizable (por ejemplo, parte de una enzima quimérica). En dicho caso, se usa un dimerizador (véase la Sección 5.1.4), que se une a los dominios de unión dimerizadores y dimeriza (entrecruza de manera reversible) la proteína de fusión del dominio de unión a ADN y la proteína de fusión del dominio de activación, formando un factor de transcripción bifuncional. Véase, por ejemplo, el sistema Ariad ARGENT™, que se describe en la Publicación de Estados Unidos Nº 2002/0173474, Publicación de Estados Unidos Nº 200910100535, Patente de Estados Unidos Nº 5.834.266, Patente de Estados Unidos Nº 7.109.317, Patente de Estados Unidos Nº 7.485.441, Patente de Estados Unidos Nº 5.830.462, Patente de Estados Unidos Nº 5.869.337, Patente de Estados Unidos Nº 5.871.753, Patente de Estados Unidos Nº 6.011.018, Patente de Estados Unidos Nº 6.043.082, Patente de Estados Unidos Nº 6.046.047, Patente de Estados Unidos Nº 6.063.625, Patente de Estados Unidos Nº 6.140.120, Patente de Estados Unidos Nº 6.165.787, Patente de Estados Unidos Nº 6.972.193, Patente de Estados Unidos Nº 6.326.166, Patente de Estados Unidos Nº 7.008.780, Patente de Estados Unidos Nº 6.133.456, Patente de Estados Unidos Nº 6.150.527, Patente de Estados Unidos Nº 6.506.379, Patente de Estados Unidos Nº 6.258.823, Patente de Estados Unidos Nº 6.693.189, Patente de Estados Unidos Nº 6.127.521, Patente de Estados Unidos Nº 6.150.137, Patente de Estados Unidos Nº 6.464.974, Patente de Estados Unidos Nº 6.509.152, Patente de Estados Unidos Nº 6.015.709, Patente de Estados Unidos Nº 6.117.680, Patente de Estados Unidos Nº 6.479.653, Patente de Estados Unidos Nº 6.187.757, Patente de Estados Unidos Nº 6.649.595, Patente de Estados Unidos Nº 6.984.635, Patente de Estados Unidos Nº 7.067.526, Patente de Estados Unidos Nº 7.196.192, Patente de Estados Unidos Nº 6.476.200, Patente de Estados Unidos Nº 6.492.106, documentos WO 94/18347, WO 96/20951, WO 96/06097, WO 97/31898, WO 96/41865, WO 98/02441, WO 95/33052, WO 99110508, WO 99110510, WO 99/36553, WO 99/41258, WO 01114387, el Kit de Retrovirus de Transcripción Regulado de ARGENT™, Versión 2,0 (9109102), y el Kit del Plásmido de Transcripción Regulado de ARGENT™, Versión 2,0 (9109/02), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización, administrando una unidad dimerizable, las células diana se modifican para expresar conjuntamente dos proteínas de fusión que el agente farmacológico usado dimeriza: una que contiene un dominio de unión a ADN (DBD) del factor de transcripción que se une al promotor inducible que controla al ablacionador y la otra que contiene un dominio de activación (AD) transcripcional del factor de transcripción que activa el promotor inducible que controla al ablacionador, cada uno fusionado para dimerizar dominios de unión. La expresión de las dos proteínas de fusión puede ser constitutiva, o como un rasgo de seguridad añadido, inducible. Cuando se selecciona un promotor inducible para la expresión de una de las proteínas de fusión, el promotor puede ser regulable, pero diferente de cualquier otro promotor inducible o regulable en la composición viral. La adición de un agente farmacológico, o "dimerizador" (descrito en la Sección 5.1.4) que puede interactuar simultáneamente con los dominios de unión dimerizadores presentes en ambas proteínas de fusión da como resultado el reclutamiento de la proteína de fusión AD para el promotor regulado, iniciando la transcripción del ablacionador. Usando dominios de unión dimerizadores que no tengan afinidad entre sí en ausencia de ligando y un promotor mínimo apropiado, la transcripción se realiza absolutamente dependiente de la adición del dimerizador. Idóneamente, una composición de virus con replicación defectuosa de la invención puede contener más de un dominio dimerizable. Los diversos virus con replicación defectuosa en una composición pueden ser de diferentes reservas, lo que proporciona unidades de transcripción diferentes (por ejemplo, una proteína de fusión para formar una unidad dimerizable *in situ*) y/o ablacionadores adicionales.

Las proteínas de fusión que contienen uno o más dominios de factor de transcripción se desvelan en los documentos WO 94/18317, PCT/US94/08008, Spencer et al, citado anteriormente y Blau et al. (PNAS 1997 94: 3076) que se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad. En el documento PCT/US95/10591 se desvela el diseño y el uso de dichas proteínas de fusión para la genosupresión (*gene-knock out*) mediada por ligando y para el bloqueo de la expresión génica mediada por ligando o inhibición de la función del producto génico. Los nuevos dominios de unión a ADN y secuencias de ADN a las cuales se unen que son útiles en las realizaciones que implican la transcripción regulada de un gen diana, se desvelan, por ejemplo, en Pomeranz et al, 1995, Science 267: 93 96. Estas referencias proporcionan una información, orientación y ejemplos sustanciales relacionados con el diseño, la construcción y el uso de construcciones de ADN que codifican proteínas de fusión análogas, construcciones génicas diana, y otros aspectos que también pueden ser útiles para el facultativo que pone en práctica la invención en cuestión.

Preferentemente el dominio de unión a ADN, y una proteína de fusión que lo contiene, se une su secuencia de ADN reconocida con suficiente selectividad, de manera la unión a la secuencia de ADN seleccionada puede detectarse (directa o indirectamente según se mida *in vitro*) a pesar de la presencia de otras secuencias, a menudo numerosas, de ADN. Preferentemente, la unión de la proteína de fusión que comprende el dominio de unión a ADN a la secuencia de ADN seleccionada es al menos dos, más preferentemente tres e incluso más preferentemente más de cuatro órdenes de magnitud mayor que la unión de cualquier secuencia de ADN alternativa, según se mida mediante estudios de unión *in vitro* o midiendo tasas o niveles relativos de transcripción de genes asociados con la secuencia

de ADN seleccionada en comparación con cualquiera de las secuencias de ADN alternativas. Las unidades de dominio de factor de transcripción (TF) dimerizables de la invención pueden codificar dominios de unión a ADN y dominios de activación de cualquier factor de transcripción conocido en la técnica. Como ejemplos de dichos factores de transcripción se incluyen, pero sin limitación, GAL4, ZFHD1, VPI6 y NF-KB (p65).

El dominio de unión dimerizador codificado por una unidad dimerizable de la invención puede ser cualquier dominio de unión dimerizador descrito en la Publicación de Estados Unidos Nº 2002/0173474, Publicación de Estados Unidos Nº 200910100535, Patente de Estados Unidos Nº 5.834.266, Patente de Estados Unidos Nº 7.109.317, Patente de Estados Unidos Nº 7.485.441, Patente de Estados Unidos Nº 5.830.462, Patente de Estados Unidos Nº 5.869.337, Patente de Estados Unidos Nº 5.871.753, Patente de Estados Unidos Nº 6.011.018, Patente de Estados Unidos Nº 6.043.082, Patente de Estados Unidos Nº 6.046.047, Patente de Estados Unidos Nº 6.063.625, Patente de Estados Unidos Nº 6.140.120, Patente de Estados Unidos Nº 6.165.787, Patente de Estados Unidos Nº 6.972.193, Patente de Estados Unidos Nº 6.326.166, Patente de Estados Unidos Nº 7.008.780, Patente de Estados Unidos Nº 6.133.456, Patente de Estados Unidos Nº 6.150.527, Patente de Estados Unidos Nº 6.506.379, Patente de Estados Unidos Nº 6.258.823, Patente de Estados Unidos Nº 6.693.189, Patente de Estados Unidos Nº 6.127.521, Patente de Estados Unidos Nº 6.150.137, Patente de Estados Unidos Nº 6.464.974, Patente de Estados Unidos Nº 6.509.152, Patente de Estados Unidos Nº 6.015.709, Patente de Estados Unidos Nº 6.117.680, Patente de Estados Unidos Nº 6.479.653, Patente de Estados Unidos Nº 6.187.757, Patente de Estados Unidos Nº 6.649.595, Patente de Estados Unidos Nº 6.984.635, Patente de Estados Unidos Nº 7.067.526, Patente de Estados Unidos Nº 7.196.192, Patente de Estados Unidos Nº 6.476.200, Patente de Estados Unidos Nº 6.492.106, documentos WO 94/18347, WO 96/20951, WO 96/06097, WO 97/31898, WO 96/41865, WO 98/02441, WO 95/33052, WO 99110508, WO 99110510, WO 99/36553, WO 99/41258, WO 01114387, el Kit de Retrovirus de Transcripción Regulado de ARGENT™, Versión 2,0 (9109102), y el Kit del Plásmido de Transcripción Regulado de ARGENT™, Versión 2,0 (9109/02), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Un dominio de unión dimerizador que puede usarse en el sistema PITA es la inmunofilina FKBP (proteína de unión a FK506). La FKBP es una proteína citoplasmática abundante de 12 kDa que actúa como el receptor intracelular para los fármacos inmunosupresores FK506 y rapamicina. La transcripción regulada puede obtenerse mediante copias múltiples de fusión de FKBP con un dominio de unión a ADN de un factor de transcripción y un dominio de activación de un factor de transcripción, seguido de la adición de FK1012 (un homodímero de FK506; Ho, S.N., et al., 1996, Nature, 382(6594): 822-6); o análogos sintéticos más sencillos tales como AP1510 (Amara, J.F., et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 94(20): 10618-23). La fuerza de estos sistemas puede mejorarse usando dimerizadores sintéticos, tales como AP1889, con 'salientes' diseñados que minimizan interacciones con la FKBP endógena (Pollock et al., 1999, Methods Enzymol, 1999.306: p. 263-81). Estrategias mejoradas basadas en la heterodimerización, aprovechan el descubrimiento de que la FK506 y la rapamicina funcionan de manera natural poniendo en contacto FKBP con una segunda proteína diana. Esto permite que se usen los propios productos naturales, o sus análogos, directamente como dimerizadores para controlar la expresión génica.

Se ha descrito la estructura de FKBP-FK506 formando complejo con la calcineurina fosfatasa (Griffith et al., Cell, 82: 507-522, 1995). Se observó que la calcineurina A (restos 12 a 394) era eficaz como un dominio de unión dimerizador usando un sistema de tres híbridos en levaduras usando tres FKBP fusionadas a Gal4 y los restos 12 a 394 de la calcineurina A murina fusionados en el extremo C con el dominio de activación Gal4 (Ho, 1996 Nature. 382: 822-826). La adición de FK506 activó la transcripción de un gen indicador en estas células. Un dominio de calcineurina "mínimo" denominado CAB, que es un dominio más pequeño y más manejable, puede usarse como un dominio de unión dimerizador.

La proteína de fusión del dominio de unión a ADN y la proteína de fusión del dominio de activación, codificadas por las unidades de proteína de fusión dimerizables de la invención, pueden contener una o más copias de uno o más dominios de unión dimerizadores diferentes. Los dominios de unión dimerizadores pueden estar en el extremo N, en el extremo C, o estar intercalados con respecto al dominio de unión a ADN y al dominio de activación. Las realizaciones que implican copias múltiples de dominios de unión dimerizadores normalmente tienen 2, 3 o 4 de dichas copias. Los diversos dominios de las proteínas de fusión están opcionalmente separados por regiones peptídicas de unión que pueden proceder de uno de los dominios adyacentes o pueden ser heterólogos.

De la manera en la que se usa en el presente documento, el término "variantes" en el contexto de variantes de dominios de unión dimerizadores se refiere a dominios de unión dimerizadores que contienen delecciones, inserciones, sustituciones, u otras modificaciones relativas a los dominios de unión dimerizadores nativos, pero que conservan su especificidad para unirse a los dimerizadores. Preferentemente, las variantes de dominios de unión dimerizadores tienen delecciones, inserciones, sustituciones y/u otras modificaciones de no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 resto de aminoácido. En una realización específica, la variante de un dominio de unión dimerizador tiene la secuencia nativa de un dominio de unión dimerizador como se ha especificado anteriormente, excepto que se añaden o delecionan de 1 a 5 aminoácidos del extremo carboxilo y/o del extremo amino de los dominios de unión dimerizadores (cuando los aminoácidos añadidos son los aminoácidos (o aminoácido) flanqueantes presentes en los dominios de unión dimerizadores nativos).

Para conservar espacio dentro del genoma (o genomas) viral, pueden modificarse por ingeniería genética unidades de transcripción bicistrónicas. Por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción pueden modificarse por ingeniería genética como una unidad bicistrónica que contiene un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), que permite la expresión conjunta de productos génicos heterólogos mediante un mensaje a partir de un solo promotor.

5 Como alternativa, un solo promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contiene, en una sola fase de lectura abierta (ORF), dos o tres genes heterólogos (por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción) separadas entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (por ejemplo, T2A) o un sitio de reconocimiento de proteasas (por ejemplo, furina). Por tanto la ORF codifica una sola poliproteína, que, bien durante (en el caso de T2A) o después de la traducción, se escinde en las dos proteínas individuales. Sin embargo debe observarse, que

10 aunque estos IRES y sistemas de poliproteína pueden usarse para ahorrar espacio en el empaquetamiento de VAA, solamente pueden usarse para la expresión de componentes que pueden dirigirse por el mismo promotor.

Como se ilustra en los siguientes ejemplos, varios componentes de la invención pueden incluir:

15 ITR: repeticiones terminales invertidas (ITR *inverted terminal repeats*) de VAA de serotipo 2 (168 pb). En una realización, las ITR VAA2 se seleccionan para generar un VAA pseudotipificado, es decir, un VAA que tiene una cápside de un VAA diferente de la del VAA del cual proceden las ITR.

CMV: promotor de citomegalovirus (CMV) completo; incluyendo potenciador. CMV: promotor CMV mínimo, no incluyendo potenciador. En una realización, se selecciona el promotor y/o potenciador del CMV humano.

20 Fusión FRB-TA: fusión del dominio de unión dimerizador y un dominio de activación de un factor de transcripción. El fragmento FRB corresponde a los aminoácidos 2021-2113 de FRAP (proteína asociada a FKBP rapamicina, también conocida como mTOR [diana de rapamicina de mamífero]), un homólogo de fosfoinositida 3-quinasa que controla el crecimiento y la división celular.

La secuencia FRAP incorpora la única mutación puntual Thr2098Leu (FRAP_L) que permite el uso de determinados análogos de rapamicina (rapálogos) no inmunosupresores. FRAP se une a la rapamicina (o a sus análogos) y a FKBP y se fusiona a una parte de p65 de NF-KB humano (190 aminoácidos) como activador de la transcripción.

25 Fusión ZFHD-FKBP: fusión de un dominio de unión a ADN y 1 copia de un dominio de unión dimerizador, 2 copias de dominio de unión a fármaco (2xFKBP) o 3 copias (3xFKBP) de dominio de unión a fármaco. La inmunofilina FKBP (proteína de unión a FK506) es una proteína citoplasmática abundante de 12 kDa que actúa como el receptor intracelular para los fármacos inmunosupresores FK506 y rapamicina. ZFHD es un dominio de unión a ADN compuesto de un par de dedos de cinc y un homeodominio. En otra alternativa, pueden seleccionarse diversos otros números de copias de un dominio de unión a fármacos seleccionado. Dichas proteínas de fusión pueden contener secuencias de localización nuclear en el extremo N-terminal de c-Myc humano en el extremo 5' y/o 3'.

30 Z8I: contiene 8 copias del sitio de unión de ZFHD (Z8) seguido de un promotor mínimo del gen de la interleucina-2 (IL-2) humana (SEC ID N°: 32). Pueden usarse variantes de este, por ejemplo, que contengan de 1 a aproximadamente 20 copias del sitio de unión para ZFHD seguido por un promotor, por ejemplo, el promotor mínimo de IL-2 u otro promotor seleccionado.

35 Cre: recombinasa Cre. Cre es una topoisomerasa de tipo I aislada del bacteriófago P1. Cre actúa como mediador en la recombinación específica de sitio en el ADN entre dos sitios loxP lo que conduce a la delección o a la conversión génica (1029 pb, SEC ID N°: 33).

40 I-SceI: un miembro de endonucleasas intrón o endonucleasas de movimiento dirigido (*homing*) que es una clase de meganucleasas grandes (708 pb, SEC ID N°: 34). Están codificadas por elementos genéticos móviles tales como intrones encontrados en bacterias y plantas. I-SceI es una endonucleasa de levadura implicada en un proceso de movimiento dirigido intrónico. I-SceI reconoce un elemento de 18 pb asimétrico específico, una secuencia poco frecuente en el genoma de mamíferos, y crea roturas bicatenarias. Véase, Jasin, M. (1996) Trends Genet., 12, 224-228.

hGH poli A: señal de poliadenilación mínima de la GH (hormona del crecimiento) humana (SEC ID N°: 35).

45 IRES: secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma del VECM (virus de la encefalomiocarditis) (SEC ID N°: 36).

50 5.1.4. Dimerizadores y agentes farmacológicos

Como se usa en el presente documento, el término "dimerizador" es un compuesto que puede unirse a dominios de unión dimerizadores de las proteínas de fusión de dominio TF (descritas en la Sección 5.1.3) e inducir la dimerización de las proteínas de fusión. Puede usarse cualquier agente farmacológico que dimerice los dominios del factor de transcripción, según se ensaya *in vitro*. Preferentemente, puede usarse la rapamicina y sus análogos, denominados "rapálogos". Puede usarse cualquiera de los dimerizadores descritos en los siguientes documentos: Publicación de Estados Unidos N° 2002/0173474, Publicación de Estados Unidos N° 200910100535, Patente de Estados Unidos N° 5.834.266, Patente de Estados Unidos N° 7.109.317, Patente de Estados Unidos N° 7.485.441, Patente de Estados Unidos N° 5.830.462, Patente de Estados Unidos N° 5.869.337, Patente de Estados Unidos N° 5.871.753, Patente de Estados Unidos N° 6.011.018, Patente de Estados Unidos N° 6.043.082, Patente de Estados Unidos N° 6.046.047, Patente de Estados Unidos N° 6.063.625, Patente de Estados Unidos N° 6.140.120, Patente de Estados Unidos N° 6.165.787, Patente de Estados Unidos N° 6.972.193, Patente de Estados Unidos N° 6.326.166, Patente de Estados Unidos N° 7.008.780, Patente de Estados Unidos N° 6.133.456, Patente de Estados Unidos N° 6.150.527, Patente de Estados Unidos N° 6.506.379, Patente de Estados Unidos N° 6.258.823, Patente de Estados Unidos N° 6.693.189, Patente de Estados Unidos N° 6.127.521, Patente de Estados Unidos N° 6.150.137, Patente de Estados Unidos N° 6.464.974, Patente de Estados Unidos N° 6.509.152, Patente de Estados

Unidos Nº 6.015.709, Patente de Estados Unidos Nº 6.117.680, Patente de Estados Unidos Nº 6.479.653, Patente de Estados Unidos Nº 6.187.757, Patente de Estados Unidos Nº 6.649.595, Patente de Estados Unidos Nº 6.984.635, Patente de Estados Unidos Nº 7.067.526, Patente de Estados Unidos Nº 7.196.192, Patente de Estados Unidos Nº 6.476.200, Patente de Estados Unidos Nº 6.492.106, documentos WO 94/18347, WO 96/20951, WO 96/06097, WO 97/31898, WO 96/41865, WO 98/02441, WO 95/33052, WO 99/110508, WO 99/110510, WO 99/36553, WO 99/41258, WO 01/114387, el Kit de Retrovirus de Transcripción Regulado de ARGENT™, Versión 2,0 (9109102), y el Kit del Plásmido de Transcripción Regulado de ARGENT™, Versión 2,0 (9109/02), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los ejemplos de dimerizadores que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, rapamicina, FK506, FK1012 (un homodímero de FK506), análogos de rapamicina ("rapálogos") que se preparan fácilmente mediante modificaciones químicas del producto natural para añadir un "saliente" que reduzca o elimine la afinidad por FKBP y/o FRAP endógenas. Los ejemplos de rapálogos incluyen, pero sin limitación, rapálogos tales como AP26113 (Ariad), AP1510 (Amara, J.F., et al., 1997, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 94(20): 10618-23) AP22660, AP22594, AP21370, AP22594, AP23054, AP1855, AP1856, AP1701, AP1861, AP1692 y AP1889, con 'salientes' diseñados que minimizan las interacciones con la FKBP endógena.

Otros dimerizadores capaces de unirse a dominios de unión dimerizadores o a otros constituyentes endógenos pueden identificarse fácilmente usando diversas estrategias, incluyendo presentación de fagos y otras estrategias biológicas para identificar compuestos de unión a peptidilo; estrategias de diversidad o combinatorias sintéticas (véase, por ejemplo, Gordon et al, 1994, J Med Chem 37(9): 1233-1251 y 37(10): 1385-1401); y DeWitt et al, 1993, PNAS Estados Unidos 90: 6909-6913) y exploración convencional o programas sintéticos. Los dimerizadores capaces de unirse a dominios de unión dimerizadores de interés pueden identificarse mediante diversos métodos de purificación por afinidad o mediante ensayos de unión directa o competitiva, incluyendo ensayos que implican la unión de la proteína a compuestos inmovilizados en soportes sólidos tales como pernos, perlas, microplacas, etc.). Véase, por ejemplo, Gordon et al., citado anteriormente.

En líneas generales, el dimerizador puede unirse a dos (o más) moléculas de proteína, en cualquier orden o simultáneamente, preferentemente con un valor Kd por debajo de aproximadamente 10^{-6} más preferentemente por debajo de aproximadamente 10^{-7} , incluso más preferentemente por debajo de aproximadamente 10^{-8} y en algunas realizaciones por debajo de aproximadamente 10^{-9} M. Preferentemente el dimerizador no es una proteína y tiene un peso molecular menor de aproximadamente 5 kDa. Las proteínas así oligomerizadas pueden ser iguales o diferentes.

Varios dimerizadores son hidrófobos o pueden prepararse de este modo mediante modificación apropiada con grupos lipófilos. Particularmente, los dimerizadores que contienen fracciones de unión pueden modificarse para potenciar la lipofilia incluyendo a la fracción enlazadora una o más cadenas laterales alifáticas de aproximadamente 12 a 24 átomos de carbono.

5.1.5. Generación de composiciones de virus con replicación defectuosa

Cualquier virus adecuado para la transferencia génica (por ejemplo, terapia génica) puede usarse para el empaquetamiento de las unidades de transcripción en una o más reservas de virus con replicación defectuosa, incluyendo pero sin limitación, virus adenoasociados ("VAA"); adenovirus; alfavirus; herpesvirus; retrovirus (por ejemplo, lentivirus); virus de la vacuna; etc. En la técnica se conocen bien métodos para el empaquetamiento de genes extraños en virus con replicación defectuosa que pueden usarse para preparar los virus con replicación defectuosa que contienen la unidad transgénica terapéutica, la unidad de ablación, y opcionalmente (aunque preferentemente), la unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable. Véase, por ejemplo, Gray y Samulski, 2008, "Optimizing gene delivery vectors for the treatment of heart disease," Expert Opin. Biol. Ther. 8: 911-922; Murphy y High, 2008, "Gene therapy for haemophilia," Br. J. Haematology 140: 479-487; Hu, 2008, "Baculoviral vectors for gene delivery: A review," Current Gene Therapy 8: 54-65; Gomez et al., 2008, "The poxvirus vectors MV A and NYV AC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer," Current Gene Therapy 8: 97-120.

En la invención, se generan composiciones de virus con replicación defectuosa para su uso terapéutico usando un VAA. En la técnica se conocen métodos para generar y aislar VAA adecuados para terapia génica. Véase, en líneas generales, por ejemplo, Grieger y Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning et al., 2008, "Recent developments in adenoassociated virus vector technology," J. Gene Med. 10: 717-733; y las referencias citadas más adelante, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

El virus adenoasociado (del género *Dependovirus*, familia *Parvoviridae*) es un virus de ADN pequeño / (de aproximadamente 20-26 nm), sin envoltura, monocatenario (mc) que infecta a seres humanos y a otros primates. Actualmente se sabe que el virus adenoasociado no causa enfermedad. El virus adenoasociado puede infectar a células que se dividen y a células que no lo hacen. En ausencia de virus auxiliar funcional (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus) la replicación del VAA es defectuosa. Los virus adenoasociados forman concatámeros episomales en el

núcleo de la célula hospedadora. En las células que no se dividen, estos concatámeros permanecen intactos durante toda la vida de la célula hospedadora. En las células que se dividen, el ADN del VAA se pierde a través de la división celular, dado que el ADN episomal no se replica junto con el ADN de la célula hospedadora. Sin embargo, el ADN del VAA también puede integrarse a bajos niveles en el genoma del hospedador.

El genoma del VAA está constituido por ADNmc, de sentido positivo o negativo, que tiene aproximadamente 4,7 kilobases de longitud. El genoma del VAA, tal y como se produce en la naturaleza, comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) en ambos extremos de la cadena de ADN, y dos fases de lectura abierta (ORF): rep y cap. La primera está compuesta por cuatro genes solapantes que codifican las proteínas Rep que son necesarias para el ciclo de vida del VAA y la última contiene secuencias solapantes que codifican las proteínas de la cápside (Cap): VP1, VP2 y VP3, que interaccionan para formar una cápside de una simetría icosaédrica.

Cada una de las ITR tiene 145 bases y forman una horquilla que contribuye a lo que se denomina "auto-cebado" que permite la síntesis independiente de primasa de la segunda cadena del ADN. Las ITR también parecen ser necesarias para la integración del ADN de VAA en el genoma de la célula hospedadora (por ejemplo, en el cromosoma 19 en seres humanos) y rescate del mismo, así como para la encapsidación eficaz del ADN del VAA y ensamblaje de partículas de VAA.

Para empaquetar un transgén en viriones, las ITR son los únicos componentes del VAA necesarios en *cis* en la misma construcción que la del transgén. Los genes de cap y rep pueden proporcionarse en *trans*. Por consiguiente, las construcciones de ADN pueden diseñarse de tal manera que las ITR de VAA flanqueen una o más de las unidades de transcripción (es decir, la unidad transgénica, la unidad de ablación y la unidad del factor de transcripción dimerizable), definiendo de esta manera la región a amplificar y a empaquetar – siendo la única limitación del diseño el límite superior del tamaño del ADN a empaquetar (aproximadamente de 4,5 kb). Más adelante se describen selecciones de modificaciones por ingeniería genética y de diseño de virus adenoasociados que pueden usarse para para ahorrar espacio.

Composiciones y sistema que utilizan construcciones de 10x dedos de cinc

La invención proporciona un método para la administración, mediada por vectores, de un producto terapéutico que tiene un sistema de ablación de la expresión génica controlado. Por comodidad, el método se describe en el contexto de un vector basado en VAA. Sin embargo, un experto en la técnica puede seleccionar otro vector adecuado (por ejemplo, un adenovirus con replicación defectuosa, un lentivirus con replicación defectuosa u otro elemento genético o viral) para su uso con las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de vectores virales y de otros vectores se describen anteriormente y se incorporan en el presente documento por referencia. En una realización, un vector VAA contiene una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto vacunal o terapéutico (u otro gen o secuencia de interés) unida operativamente a un promotor que controla la transcripción y al menos un sitio de ablación de endonucleasa que comprende una secuencia de al menos 30 pares de bases de ácido nucleico que reconoce de manera específica y selectiva una construcción de al menos diez (10X) dedos de cinc. El al menos un sitio de ablación de endonucleasa se localiza al menos en posición 5' con respecto a la secuencia que codifica el gen de interés (por ejemplo, un transgén tal como ADN, ARN, ribozima, ARNip, ARNhp, miARN o una proteína, péptido, rutas de sistemas biológicos modificadas por ingeniería genética, etc.). El método implica adicionalmente el uso de al menos un ablacionador que comprende una endonucleasa química que comprende al menos diez dedos de cinc unidos a un dominio catalítico de endonucleasa funcional en asociación operativa con un promotor, en el que la actividad de transcripción y/o ablación está inducida en respuesta a un agente farmacológico. Los al menos diez (10X) dedos de cinc, reconocen de manera específica y selectiva, la secuencia de al menos aproximadamente 30 pares de bases en al menos un sitio de ablación de endonucleasa y contiene al menos 10 hélices de reconocimiento seleccionadas de manera independiente.

En una realización, la presente invención utiliza endonucleasas químicas como una medida de seguridad necesaria para destruir un gen de interés en aplicaciones de administración de genes *in vivo* [incluyendo terapia génica, vacunas, etc.], por ejemplo cuando un producto transgénico ya no se requiere o presenta efectos tóxicos/no diana en el organismo. Por tanto, las endonucleasas químicas de la invención tienen una o más de las siguientes características. Intencionalmente dirigen secuencias que no están presentes en genomas de mamíferos (por ejemplo, seres humanos) (de ahí la expresión "secuencia única de al menos 30 pb"), tienen alta selectividad *in vivo* hacia una localización diana solamente, y tienen efectos no diana y citotóxicos mínimos. Debido al hecho que las endonucleasas descritas anteriormente en la bibliografía se usaron para un propósito diferente, es decir, para la modificación por ingeniería genética *in situ* de genomas de mamíferos para permitir la genosupresión o corrección (*knock-in*) de genes de interés específicos, los inventores precisaron desarrollar una nueva metodología para diseñar una endonucleasa química con las características requeridas para la presente invención, incluyendo el diseño de tramos largos (es decir, de más de 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más dedos de cinc) y la selección de secuencias exclusivas que no están presentes dentro de un genoma diana (por ejemplo, un ser humano u otro mamífero).

En una realización, las proteínas de dedo de cinc se modifican por ingeniería genética para dirigirse específicamente a una secuencia de ADN que no forma parte del genoma diana, para mitigar los efectos no diana y la citotoxicidad asociados con los diseños normalmente usados.

Por ejemplo, para la administración a seres humanos, se generan secuencias al azar de al menos 32 pares de bases para dar cabida a desplazamientos de fase, aunque pueden seleccionarse secuencias más pequeñas (por ejemplo, de al menos 30 pares de bases). Este tamaño se seleccionó porque en el genoma humano hay aproximadamente $3,4 \times 10^9$ pares de bases. El número de todas las posibles secuencias de 15 pb de longitud con permutación de 4 nucleótidos es de 4^{15} , que es la misma que aproximadamente 10^9 . Lo que significa que para cualquier secuencia de ADN determinada que sea igual a o menor de 15 pares de bases, puede encontrarse una subsecuencia idéntica dentro del genoma humano. A la inversa, para cualquier secuencia de ADN corta, habrá al menos 15 posiciones que sean idénticas a una parte de la secuencia de ADN humano. Durante la evaluación inicial, se identificaron secuencias no cortas cuya identidad de secuencia máxima con cualquier secuencia de ADN humano es menor de 65 %.

De manera sorprendente, se descubrió que la primera secuencia exclusiva, generada al azar, para su uso como un sitio de reconocimiento de ablación y sometida a ensayo, cumplía los parámetros deseados: SEC ID N°: 806-GGTCGATGTTGCGCAACGTCGATCGTACGTGCA. Los ejemplos indicados más adelante ilustran la secuencia que se modifica por ingeniería genética en un vector de expresión plasmídico, que lleva el gen de interés, y que reconoce específicamente una endonucleasa quimérica de la invención que comprende al menos diez dedos de cinc. Las secuencias que codifican el sitio de reconocimiento de ablación y las secuencias de la endonucleasa quimérica pueden modificarse por ingeniería genética en vectores de virus adecuados (por ejemplo, vectores basados en VAA) usando técnicas convencionales para obtener las composiciones basadas en vectores VAA y llevar a cabo los métodos de la invención.

Con referencia a la Figura 218, se proporciona un método optimizado para seleccionar una secuencia exclusiva de la invención. Esto implica generar al azar 2 millones de secuencias de ADN corto y seleccionar las que tengan una identidad de secuencia menor de (<) 20 % con respecto a las otras. Las secuencias resultantes se comparan mediante BLAST usando parámetros convencionales frente al genoma diana (por ejemplo, humano) y se seleccionan las que tengan un valor E mayor de 100. [Un valor E es un valor Esperado. El umbral del significado estadístico para presentar coincidencias frente a secuencias de bases de datos; el valor por defecto es 10, lo que significa que se espera encontrar 10 coincidencias simplemente por casualidad, de acuerdo con el modelo estocástico de Karlin y Altschul (1990). Si el significado estadístico atribuido a una coincidencia es mayor que el umbral Esperado, la coincidencia no se presentará. Los umbrales Esperados más bajos son más rigurosos, lo que conduce a presentar coincidencias de menor casualidad. El aumento del umbral muestra coincidencias menos rigurosas. Los valores fraccionarios son aceptables]. La similitud de una secuencia ejemplar se compara con respecto a la del genoma humano con una ventana deslizante. [Para ventanas deslizantes una ventana de 32 pares de bases se desliza sobre los nucleótidos del genoma humano. La ventana mueve 1 nucleótido por cada etapa, para cada posición de la ventana se calculan los niveles de identidad]. Cualquier secuencia con una similitud mayor del 70 % se descarta. Si la secuencia tiene una similitud menor de 70 %, entonces esta se analiza frente al genoma diana para determinar la presencia de cualquiera de los 8 pares de bases consecutivos y cualquiera que tenga 8 o más pares de bases consecutivos en común con la secuencia diana se descarta. El resto puede seleccionarse para su uso en un sitio de reconocimiento de ablación.

Por tanto, para un sitio de reconocimiento de ablación de la invención, una secuencia exclusiva tiene una identidad menor de 70 % con cualquier subsecuencia presente en el genoma humano y no tiene más de 8 posiciones adyacentes idénticas con cualquier subsecuencia en el genoma humano. Después de eso, se diseña un dedo de cinc que dirige específicamente esta secuencia como se describe en el presente documento. Diferentes diseños de dedo de cinc, que reconocen diferentes fases de lectura, pueden leer la secuencia exclusiva, de tal manera que es posible que dos dedos de cinc distintos sean específicos de una sola secuencia exclusiva de al menos 32 pb. Las secuencias pueden tener una longitud de 32, 33, 34, 35, 36, 38, 41, 44 o más pares de bases.

Además de la secuencia exclusiva identificada anteriormente, también se generaron otras secuencias exclusivas para su uso en el sitio de reconocimiento de ablación:

SEC ID N°: 801: SEC ID N°: GGTCGGCGACGCGAATCGTCGATTGGCGTAC
 SEC ID N°: 802: SEC ID N°: GGTCGGCGACGCGTATCGATTGGCGTAC y
 (SEC ID N°: 803: ACTATTGGCACGCCGTACGATAGTCGGCGCGA.

Una vez seleccionada la secuencia del sitio de ablación específico, el ablacionador puede modificarse por ingeniería genética para que contenga la proteína de dedo de cinc que reconocerá específicamente esta secuencia exclusiva de al menos 30 pb dentro del sitio de ablación del vector que lleva el gen de interés.

En una realización, una endonucleasa quimérica de la invención se modifica por ingeniería genética para que contenga al menos el dominio catalítico de una endonucleasa fusionado con una proteína de dedo de cinc, opcionalmente mediante un enlazador. El dominio catalítico puede localizarse en el extremo N del dedo de cinc, en el extremo C del dedo de cinc o puede localizarse dentro del dedo de cinc (es decir, el dominio catalítico está flanqueado en sus dos extremos N y C por módulos de dedo de cinc). Opcionalmente, las señales de localización nuclear se incluyen en el extremo N o C de la endonucleasa quimérica o en el extremo N o C de la parte de dedo de

cinc de la proteína. Estos elementos se describen en cualquier parte en la memoria descriptiva, cuyas entradas se incorporan por referencia en el presente documento.

En una realización, se usa el dominio catalítico FokI sin ninguna otra secuencia funcional de la endonucleasa FokI, es decir, el dominio de unión a ADN no está presente. Además, debido a la manera en la que se ha modificado por ingeniería genética la endonucleasa quimérica descrita en el presente documento, no se necesita el sitio de reconocimiento de FokI (5'-CATCC-3') conocido. El dominio catalítico FokI es una endonucleasa no específica de secuencia, una vez que el ablacionador reconoce el sitio de ablación, la localización en el sitio de reconocimiento de ablación en la que FokI corta puede alterarse a través de la longitud de la secuencia enlazadora opcional entre el

dominio catalítico FokI y los dedos de cinc. Por ejemplo, una secuencia enlazadora de cinco aminoácidos (por ejemplo, SEC ID N°: 805, GTSGK) produce el ablacionador quimérico de FokI que corta 6 pb directamente después del sitio de unión de dedo de cinc. [La longitud del enlazador se define usando la convención expuesta en Yuka Shimizu, et al, BioorgMed Chem Lett. 15 de julio del 2009; 19(14): 3970-3972]. Por tanto, la localización del corte realizado por el ablacionador quimérico de FokI puede ajustarse aumentando o disminuyendo la longitud del enlazador. Por ejemplo, para el ablacionador quimérico, pueden usarse otros enlazadores (de 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos de longitud) en combinación con espaciadores de una longitud de 6, 7, 8, 9, o más en el sitio de ablación.

El dedo de cinc es una proteína modular que une ADN en orientación inversa (es decir, une el extremo N del dedo de Zn comenzando en el extremo 3' de la cadena en sentido). Típicamente, cada módulo o dedo usa los aminoácidos en las posiciones: -1, 3 y 6 de su hélice α para dirigir un sitio de reconocimiento específico de 3 pb en el ADN (es decir, un "triplete"). Estas hélices son específicas y se seleccionan para tripletes de ADN específicos. Por tanto, para una proteína de 10x dedos de cinc, cada uno de los 10 dedos de cinc (o módulos) puede seleccionarse independientemente para dirigir los tripletes exclusivos presentes en la secuencia de ácido nucleico de al menos 30 pb de la invención.

Los inventores han demostrado la ablación específica y selectiva de acuerdo con la invención usando un dominio catalítico de FokI fusionado con una proteína de 10x dedos de cinc específica de la secuencia exclusiva del ablacionador. Dada la descripción en la técnica de dedos de cinc de tamaños significativamente más pequeños (2-3) y una publicación reciente de que dedos de cinc más grandes de 6x no son proteínas satisfactorias [Yuka Shimizu, et al, Adding Fingers to an Engineered Zinc Finger Nuclease Can Reduce Activity, Biochemistry 2011, 50, 5033-5041], este resultado fue inesperado.

Una vez conocido el tamaño y la secuencia de la secuencia de ácido nucleico exclusiva de 30 pares de bases del sitio de reconocimiento de ablación (por ejemplo, al menos 30 pares de bases que el vector administra a un ser humano), se puede modificar por ingeniería genética un dedo de cinc que proporcione al menos un módulo (1X) para cada triplete. Cada dedo de cinc contiene una hélice de reconocimiento específica para un triplete determinado, en el que la secuencia de reconocimiento de hélice se modifica por ingeniería genética para plegarse en una estructura de dedo de cinc conservada con el fin de presentar la secuencia de aproximadamente siete aminoácidos en la forma helicoidal correcta. Más particularmente, en la siguiente tabla, los solicitantes proporcionan una selección de secuencias conservadas ilustrativas que pueden usarse para construir un dedo de cinc. En esta tabla, los siete guiones representan la localización en la cual puede insertarse una de las secuencias de reconocimiento de hélice de siete aminoácidos para construir un dedo de cinc múltiple (X).

Tabla - Secuencias de dedo de cinc conservadas	
	SEC ID N°:
CRCNECGKSFS-----HQRT	706
QFACDICGRKFA-----HTKIH	707
FACEVCGVRFT-----HMRKH	708
FACSWQDCNKKFA-----HYRTH	709
FECKDCGKAFI-----HQRT	710
FHCGYCEKSFS-----HIRTH	711
FKCPVCGKAFT-----HQRT	712
FLCQYCAQRFG-----HMKSH	713
FQCKTCQRKFS-----HTRTH	714
FQCNQCGASFT-----HIKLI	715

Tabla - Secuencias de dedo de cinc conservadas	
	SEC ID N°:
FSCSWKGCERRFA-----HRRTH	716
GSQKPFQCRICMRNFS-----HIRTH	717
HKCLECGKCFS-----HQRTTH	718
MAERPFQCRICMRKFA-----HTKIH	719
PGEKKFACPECPKRFM-----HIKTH	720
PGEKPFECKDCGKAFI-----HQRTTH	721
PGEKPFKCPVCGKAFR-----HQRTTH	722
PGEKPFMCTWSYCGKRFT-HKRTTH	723
PGEKPFQCKTCQRKFS-----HTRTH	724
PGEKPFQCNQCGASFT-----HIKTH	725
PGEKPHICHIQCGKVYG-----HLRWH	726
PGEKPYECDHCGKAFS-----HRRTH	727
PGEKPYECDHCGKSFS-----HKRTTH	728
PGEKPYECEKCGKAFN-----HKKSH	729
PGEKPYECHDCGKSFR-----HRRTH	730
PGEKPYECKECGKAFS-----HQRIH	731
PGEKPYECNYCGKTFS-----HQRIH	732
PGEKPYGCHLCGKAFS-----HEMIH	733
PGEKPYICRKCGRGFS-----HQRTTH	734
PGEKPYKCEECGKAFN-----HKIVH	735
PGEKPYKCEECGKAFR-----HKIIH	736
PGEKPYKCEECGKAFT-----HKKIH	737
PGEKPYKCGQCGKFYS-----HQKIH	738
PGEKPYKCHQCGKAFI-----HERTH	739
PGEKPYKCKECGKAFN-----HRRTH	740
PGEKPYKCKECGQAFR-----HHKLH	741
PGEKPYKCKQCGKAFG-----HGRTH	742
PGEKPYKMECGKAFN-----HQRIH	743
PGEKPYKPCDCGKSFS-----HQRTTH	744
PGEKPYKPECGKSFS-----HQRTTH	745
PGEKPYMCSECGRGFS-----HQRTTH	746
PGEKPYRCEECGKAFR-----HKRIH	747
PGEKPYRCKYCDRSFS-----HVRNIH	748
PGEKPYTCKQCGKAFS-----HETTH	749
PGEKPYTSCDCGKAFR-----HRRTH	750
PGEKPYVCDVEGCTWKFA-HKKRH	751
PGEKPYVCRECGRGFR-----HKRTTH	752

Tabla - Secuencias de dedo de cinc conservadas	
	SEC ID N°:
PGEKPYVCSKCGKAFT-----HQKIH	753
PGERPFMCTWSYCGKRFT-HKRTH	754
TGEKPFACDICGKKFA-----HTKIH	755
TGEKPFACDICGRKFA-----HTKIH	756
TGEKPFQCRICMRNFS-----HIRTH	757
TGSQKPFQCRICMRNFS-----HIRTH	758
VPERPFQCQICMRNFS-----HIRTH	759
YACHLCAKAFI-----HEKTH	760
YACHLCGKAFT-----HEKTH	761
YECDHCGKAFFS-----HRRIH	762
YECDHCGKSFS-----HKRTH	763
YECDVCGKTFT-----HQRTTH	764
YECEKCGKAFN-----HKKSH	765
YECDCGKSFR-----HRRIH	766
YECKECCGKAFFS-----HQRIH	767
YECNECCGKAFA-----HQRIH	768
YECNECCGKFFS-----HRRSH	769
YECNTRKTFSS-----HQRTTH	770
YECQDCGRAFN-----HKRTH	771
YECVQCGKGFT-----HQRVH	772
YECVQCGKSYS-----HQRRH	773
YGCHLCGKAFFS-----HEMIH	774
YHCDWDGCGWKFA-----HYRKH	775
YICRKCGRGFS-----HQRTTH	776
YKCECCGKNFT-----HKRIH	777
YKCEECGKAFN-----HKIVH	778
YKCEECGKAFF ----- HKIIH	779
YKCEECGKAFT-----HKKIH	780
YKCGQCGKFYS-----HQKIH	781
YKCHQCGKAFI-----HERTH	782
YKCKECCGKAFN-----HHRIH	783
YKCKECCQAFF-----HHKLH	784
YKCKQCGKAFF-----HGRTH	785
YKCMCCGKAFN-----HQRIH	786
YKCPDCGKSFS-----HQRTTH	787
YMCSECCRGFS-----HQRTTH	788
YQCNICGKCFS-----HQRTTH	789

Tabla - Secuencias de dedo de cinc conservadas	
	SEC ID N°:
YRCEECGKAFR-----HKRIH	790
YRCKYCDRSFS-----HVRNIH	791
YRCSWEGCEWRFA-----HFRKH	792
YSCGICGKSFS-----HCILH	793
YTCKQCGKAFF-----HETTH	794
YTCSDCGKAFF-----HRRTH	795
YTCSYCGKSFT-----HTRI H	796
YVCDVEGCTWKFA-----HKKRH	797
YVCRECGRGFR-----HKRTH	798
YVCRECRRGFS-----HQRT H	799
YVCSKCGKAFT-----HQLIH	800
TGEKPFQCRICMRNFS-----HLRTH	807

Un dedo de cinc de una longitud de al menos 10x, o un dedo de cinc de otra longitud (por ejemplo, seleccionado de una aplicación no humana u otra aplicación), puede contener los módulos de dedo de cinc en los que cada una de las hélices de reconocimiento está insertada en la misma secuencia conservada. En otra realización, un ablacionador puede contener módulos de dedo de cinc que contengan hélices de reconocimiento insertadas en diferentes secuencias conservadas. En los ejemplos del presente documento, se usó la secuencia conservada (extremo N) - PGEKPYKCPECGKSFS - XXXXXXX - HQRT H (extremo carboxilo) - COOH [SEC ID N°: 745] o (extremo N) - TGEKPFQCRICMRNFS - XXXXXXX - HLRTH (extremo carboxilo) - COOH, en la que XXXXXXX [SEC ID N°: 807] es la hélice de reconocimiento de dedo de cinc que se usó. Sin embargo, la invención no se limita a estas secuencias.

De acuerdo con la invención, en una realización, la secuencia de ácido nucleico de al menos 30 pb puede tener una longitud de 32 bases de pares para dar cabida a fases de lectura alternativas para el dedo de cinc.

Dependiendo de la secuencia de la secuencia de ácido nucleico exclusiva del sitio de ablación, se seleccionan hélices de dedo de cinc específicas para la inserción en la secuencia de dedo de cinc conservada. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico exclusiva del sitio de ablación puede contener más de uno de los tripletes de tres pares bases. En este caso, se puede seleccionar la misma hélice de reconocimiento o una hélice de reconocimiento diferente.

En una realización, el dedo de cinc para la secuencia de al menos 30 pares de bases: SEC ID N°: 806: GGTGATGTTGCAACGTCGATCGTACGTGCA se modificó por ingeniería genética, de tal manera que el dedo de cinc comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos diez dedos de cinc que consisten en: (a) un primer dedo de cinc N-terminal que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a TGC; (b) un segundo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a ACG; (c) un tercer dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a CGT; (d) un cuarto dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GAT; (e) un quinto dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GTC; (f) un sexto de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a AAC; (g) un séptimo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une a CGC; (h) un octavo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GTT; (i) un noveno dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GAT; y (j) un décimo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GTC.

En los ejemplos proporcionados en el presente documento, la hélice de reconocimiento de (a) que se une específicamente a TGC es QRRSLGH (SEC ID N°: 663); la hélice de reconocimiento de (b) que se une específicamente a ACG es KKNLDR (aa 29-56 de SEC ID N°: 60); la hélice de reconocimiento de (c) que se une específicamente a CGT es SRRTCRA (SEC ID N°: 155); la hélice de reconocimiento de (d) que se une específicamente a GAT es VRHNLTR (SEC ID N°: 270); la hélice de reconocimiento de (e) que se une específicamente a GTC es DRTSLAR (SEC ID N°: 540); la hélice de reconocimiento de (f) que se une específicamente a AAC es DSGNLRV (SEC ID N°: 64); la hélice de reconocimiento de (g) que se une específicamente a CGC es HTGHLE (SEC ID N°: 151); la hélice de reconocimiento de (h) que se une

específicamente a GTT es TNQALGV (aa 197-224 de SEC ID N°: 60); la hélice de reconocimiento de (j) que se une específicamente a GAT es VRHNLTR (SEC ID N°: 270); y la hélice de reconocimiento de (k) que se une específicamente a GTC es DRTSLAR (SEC ID N°: 540). Sin embargo, existen otras hélices de reconocimiento para muchos de estos tripletes. Por ejemplo, la hélice de reconocimiento de (a) que se une específicamente a TGC puede seleccionarse del grupo que consiste en: ARNTLVH, QRRSLGH, QARSLRA, QQRSLKN y QNRSLAH, QGRSLRA, RARNLTL, RGRNLEM, RKRNLIM, RMRNLII, RNRNLVL, RRRNLHL, RRRNLTL, RSRNLDI, RSRNLLL y RSRNLTL (SEC ID N°: 658-673); la hélice de reconocimiento de (b) que se une específicamente a ACG puede seleccionarse del grupo que consiste en: KNNDLTR; KRIDLQR; RKHDLNM; RRQTLRQ; KGNDLTR; RNITLVR, RSHDLTV, ASADLTR, QNATRKR, QSGDLTR, RSQTLAQ; y RTDTLRD (SEC ID N°: 104-119); la hélice de reconocimiento de (c) que se une específicamente a CGT puede seleccionarse del grupo que consiste en RSQTRKT (SEC ID N°: 154) y SRRTCRA (SEC ID N°: 155); la hélice de reconocimiento de (d) que se une específicamente a GAT puede seleccionarse del grupo que consiste en VRHNLTR, ISHNLAR, ISSNLQR, LGNNLKR, LNSNLAR, LSTNLTR, LTHNLRR, QSSNLAR, RSDALIQ, SKQALAV, TGQQLRV, TKQRLVV, TRQRLRI, TSANLSR, TSGNLVR, TSQMLVV, TSSNLRS, TTSNLRR, VGHNLRS, VGSNLTR (SEC ID N°: 251-270); la hélice de reconocimiento de (e) que se une específicamente a GTC puede seleccionarse del grupo que consiste en DRTSLAR, DHSSLKR, APSSLRR, DATQLVR, DPGALVR, DPTSLNR, DRSALAR, DRSALSR, DRSSLRR, DRTPLNR, DRTPLQN, EGGALRR, ESGALRR, NTSLLRR, RSDVLSE, TGAVLRR, TGAVLTR, TKKILTV, TKSLLAR, TMAVLRR, TRAVLRR, TSTILAR, TSTLLKR y TSTLLNR (SEC ID N°: 530-553); la hélice de reconocimiento de (f) que se une específicamente a AAC puede seleccionarse del grupo que consiste en DRSNRKT, DSGNLRV, GASALRQ, GASALRS, GGTALRM, GGTALVM, GHTALAL, GHTALRH, GHTALRN, GPTALVN y HRTNLIA (SEC ID N°: 63-73); la hélice de reconocimiento de (g) que se une específicamente a CGC puede ser HTGHLLE (SEC ID N°: 151); y la hélice de reconocimiento de (h) que se une específicamente a GTT puede seleccionarse del grupo que consiste en HKSSLTR, TNQALGV, AATALRR, HHNSLTR, HSSSLVR, IKAILTR, INHSLRR, IRTSLKR, MNSVLKR, MTSSLRR, QATLLRR, QSSALTR, THTVLAR, TKPVLKI, TNSVLGR, TRHSLGR, TSGALTR, TSGSLTR, TSGSLVR, TSTLLKR, TSTRLDI, TTALLKR, TTSALTR, TTTVLAR y VGGSLNR (SEC ID N°: 583-607); la hélice de reconocimiento de (i) que se une específicamente a GAT puede seleccionarse del grupo que consiste en ISHNLAR, VRHNLTR, ISSNLQR, LGNNLKR, LNSNLAR, LSTNLTR, LTHNLRR, QSSNLAR, RSDALIQ, SKQALAV, TGQQLRV, TKQRLVV, TRQRLRI, TSANLSR, TSGNLVR, TSQMLVV, TSSNLRS, TTSNLRR, VGHNLRS y VGSNLTR (SEC ID N°: 251-270); y la hélice de reconocimiento de (j) que se une específicamente a GTC puede seleccionarse del grupo que consiste en DRTSLAR, DHSSLRKR, APSSLRR, DATQLVR, DPGALVR, DPTSLNR, DRSALAR, DRSALSR, DRSSLRR, DRTPLNR, DRTPLQN, EGGALRR, ESGALRR, NTSLLRR, RSDVLSE, TGAVLRR, TGAVLTR, TKKILTV, TKSLLAR, TMAVLRR, TRAVLRR, TSTILAR, TSTLLKR y TSTLLNR (SEC ID N°: 530-553).

Para estos tripletes, y otros, pueden utilizarse incluso otras hélices de reconocimiento, en diversas realizaciones de la invención. La siguiente tabla proporciona hélices de reconocimiento ilustrativas para diversos tripletes de tres pares de bases.

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
AAA	QRANLRA (SEC ID N°: 61)	QRSNLKV (SEC ID N°: 62)
AAC	DRSNRKT (SEC ID N°: 63)	GGTALVM (SEC ID N°: 68)
	DSGNLRV (SEC ID N°: 64)	GHTALAL (SEC ID N°: 69)
	GASALRQ (SEC ID N°: 65)	GHTALRH (SEC ID N°: 70)
	GASALRS (SEC ID N°: 66)	GHTALRN (SEC ID N°: 71)
	GGTALRM (SEC ID N°: 67)	GPTALVN (SEC ID N°: 72)
		HRTNLIA (SEC ID N°: 73)
AAG	RKDNLKN (SEC ID N°: 74)	RSDNLSV (SEC ID N°: 76)
	RSANLSV (SEC ID N°: 75)	RSDNLTQ (SEC ID N°: 77)
AAT	TSSNRKT (SEC ID N°: 78)	VSSNLNV (SEC ID N°: 80)
	TTGNLTV (SEC ID N°: 79)	
ACA	QNATRIN (SEC ID N°: 81)	
	SPADLTR (SEC ID N°: 82)	
ACC	DKKDLTR (SEC ID N°: 83)	
ACG	ASADLTR (SEC ID N°: 84)	RKHDLM (SEC ID N°: 90)
	KGNDLTR (SEC ID N°: 85)	RNITLVR (SEC ID N°: 91)
	KNNDLTR (SEC ID N°: 86)	RRQTLRQ (SEC ID N°: 92)
	KRIDLQR (SEC ID N°: 87)	RSHDLTV (SEC ID N°: 93)
	QNATRK (SEC ID N°: 88)	RSQTLAQ (SEC ID N°: 94)
	QSGDLTR (SEC ID N°: 89)	RTDTLRD (SEC ID N°: 95)
ACT	ARSTRTN (SEC ID N°: 96)	THLDLIR (SEC ID N°: 98)
	HASTRHC (SEC ID N°: 97)	
AGA	KNWKLQA (SEC ID N°: 99)	QSSHLTT (SEC ID N°: 101)
	QLAHLRA (SEC ID N°: 100)	RSANLAR (SEC ID N°: 102)
AGC	ERSHLRE (SEC ID N°: 103)	
AGG	DSAHLTR (SEC ID N°: 104)	RRAHLRQ (SEC ID N°: 112)
	QSAHRTK (SEC ID N°: 105)	RRTHLRV (SEC ID N°: 113)
	RGNHLVV (SEC ID N°: 106)	RSDHLKT (SEC ID N°: 114)
	RMAHLHA (SEC ID N°: 107)	RSDHLSA (SEC ID N°: 115)
	RNEHLKV (SEC ID N°: 108)	RSDHLSQ (SEC ID N°: 116)
	RPHHLDA (SEC ID N°: 109)	RSDHLTN (SEC ID N°: 117)
	RRAHLIN (SEC ID N°: 110)	RSDHLTQ (SEC ID N°: 118)
	RRAHLLS (SEC ID N°: 111)	RSSHLM (SEC ID N°: 119)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
AGT	HRTTLTN (SEC ID N°: 120)	QSAHLST (SEC ID N°: 121)
ATA	QKSSLIA (SEC ID N°: 122)	
ATG	RRDELNV (SEC ID N°: 123)	RSDSLSV (SEC ID N°: 124)
ATT	HKNALQN (SEC ID N°: 125)	
CAA	DRANLST (SEC ID N°: 126)	QSGNLTE (SEC ID N°: 128)
	QKSNLII (SEC ID N°: 127)	QSSNLTV (SEC ID N°: 129)
CAC	SKKALTE (SEC ID N°: 130)	
CAG	DSANRTK (SEC ID N°: 131)	RSDNLSE (SEC ID N°: 134)
	RADNLTE (SEC ID N°: 132)	RTDYLVD (SEC ID N°: 135)
	RSDNLRE (SEC ID N°: 133)	
CAT	DRSNRIK (SEC ID N°: 136)	TSGNLTE (SEC ID N°: 137)
CCA	DRSDLSR (SEC ID N°: 138)	QNSTRIG (SEC ID N°: 140)
	NRTDLIR (SEC ID N°: 139)	TSHSLTE (SEC ID N°: 141)
CCC	SKKHLAE (SEC ID N°: 142)	
CCG	DSSSLTR (SEC ID N°: 143)	RNDTLTE (SEC ID N°: 145)
	DYDVRKR (SEC ID N°: 144)	RSDTLSE (SEC ID N°: 146)
CCT	TKNSLTE (SEC ID N°: 147)	
CGA	QSGHLTE (SEC ID N°: 148)	QSTHLTQ (SEC ID N°: 150)
	QSSHILNV (SEC ID N°: 149)	
CGC	HTGHLLE (SEC ID N°: 151)	
CGG	RSDNLTE (SEC ID N°: 152)	RSDKLTE (SEC ID N°: 153)
CGT	RSQTRKT (SEC ID N°: 154)	SRRTCRA (SEC ID N°: 155)
CTA	DSSSRTK (SEC ID N°: 156)	QNSTLTE (SEC ID N°: 157)
CTC	ASDDLQ (SEC ID N°: 158)	
CTG	HNYARDC (SEC ID N°: 159)	RSDALSA (SEC ID N°: 162)
	RNDALTE (SEC ID N°: 160)	RSDALSN (SEC ID N°: 163)
	RSDALRE (SEC ID N°: 161)	RSDTLSE (SEC ID N°: 164)
CTT	TTGALTE (SEC ID N°: 165)	
GAA	HKPNLHR (SEC ID N°: 166)	QRNNLGR (SEC ID N°: 181)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	HRPNLRR (SEC ID N°: 167)	QRSNLAR (SEC ID N°: 182)
	LGENLRR (SEC ID N°: 168)	QRSNLVR (SEC ID N°: 183)
	OASNLAR (SEC ID N°: 169)	QRTNLQR (SEC ID N°: 184)
	OASNLRR (SEC ID N°: 170)	QSGNLAR (SEC ID N°: 185)
	OASNLTR (SEC ID N°: 171)	QSNLNR (SEC ID N°: 186)
	QDGNLGR (SEC ID N°: 172)	QSSNLTK (SEC ID N°: 187)
	QDGNLTR (SEC ID N°: 173)	QSSNLTR (SEC ID N°: 188)
	QGSNLAR (SEC ID N°: 174)	QSSNLVR (SEC ID N°: 189)
	QHPNLRR (SEC ID N°: 175)	QTNNLGR (SEC ID N°: 190)
	QKGNLRR (SEC ID N°: 176)	QTNNLNR (SEC ID N°: 191)
	QKSNLRR (SEC ID N°: 177)	QTNNLTR (SEC ID N°: 192)
	QLSNLTR (SEC ID N°: 178)	QTVNLDR (SEC ID N°: 193)
	QOSNLRR (SEC ID N°: 179)	RKPNLLR (SEC ID N°: 194)
	QOINLRR (SEC ID N°: 180)	TTTNLRR (SEC ID N°: 195)
GAC	CPSNLRR (SEC ID N°: 196)	DRANLSR (SEC ID N°: 207)
	DDANLRR (SEC ID N°: 197)	DRGNLTR (SEC ID N°: 208)
	DEANLRR (SEC ID N°: 198)	DRSNLTR (SEC ID N°: 209)
	DESNLRR (SEC ID N°: 199)	EEANLRR (SEC ID N°: 210)
	DESNLKR (SEC ID N°: 199)	EESNLRR (SEC ID N°: 211)
	DMGNLGR (SEC ID N°: 200)	EEVNLRR (SEC ID N°: 212)
	DPANLRR (SEC ID N°: 201)	EGGNLMR (SEC ID N°: 213)
	DPGNLVR (SEC ID N°: 202)	EKANLTR (SEC ID N°: 214)
	DPSNLRR (SEC ID N°: 203)	EQANLRR (SEC ID N°: 215)
	DPSNLQR (SEC ID N°: 204)	HSSNFNK (SEC ID N°: 216)
	DPSNLRR (SEC ID N°: 205)	RSDNLSE (SEC ID N°: 217)
GAG	DOGNLRR (SEC ID N°: 206)	
	KHSNLAR (SEC ID N°: 218)	RQMNLDL (SEC ID N°: 234)
	KHSNLTR (SEC ID N°: 219)	RRDNLLR (SEC ID N°: 235)
	KKTNLTR (SEC ID N°: 220)	RRDNLNR (SEC ID N°: 236)
	KSSNLRR (SEC ID N°: 221)	RSANLTR (SEC ID N°: 237)
	QSFNLRR (SEC ID N°: 222)	RSDHLSR (SEC ID N°: 238)
	REDNLGR (SEC ID N°: 223)	RSDNLAR (SEC ID N°: 239)
	RGDNLKR (SEC ID N°: 224)	RSDNLSR (SEC ID N°: 240)
	RGDNLNR (SEC ID N°: 225)	RSDNLST (SEC ID N°: 241)
	RHDQLTR (SEC ID N°: 226)	RSDNLTR (SEC ID N°: 242)
	RIDNLGR (SEC ID N°: 227)	RSDNLVR (SEC ID N°: 243)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	RKSNIQR(SEC ID N°: 228) RMSNIQR(SEC ID N°: 229) RNTNIQR(SEC ID N°: 230) RPHNIQR(SEC ID N°: 231) RODNIQR(SEC ID N°: 232) RODNIQR(SEC ID N°: 233)	RSSNLQR(SEC ID N°: 244) RTHNLKR(SEC ID N°: 245) RTHNLTR(SEC ID N°: 246) RVDNLPR(SEC ID N°: 247) SGSNFTR(SEC ID N°: 248) TNNNLAR(SEC ID N°: 249) VHWNLMR(SEC ID N°: 250)
GAT	ISHNLAR(SEC ID N°: 251) ISSNLQR(SEC ID N°: 252) LGNNLKR(SEC ID N°: 253) LNSNLAR(SEC ID N°: 254) LSTNLTR(SEC ID N°: 255) LTHNLRR(SEC ID N°: 256) QSSNLAR(SEC ID N°: 257) RSDALIQ(SEC ID N°: 258) SKQALAV(SEC ID N°: 259) TGQQLRV(SEC ID N°: 260)	TKQRLVV(SEC ID N°: 261) TRQRLRI(SEC ID N°: 262) TSANLSR(SEC ID N°: 263) TSGNLVR(SEC ID N°: 264) TSQMLVV(SEC ID N°: 265) TSSNLRR(SEC ID N°: 266) TTSNLRR(SEC ID N°: 267) VGHNLRR(SEC ID N°: 268) VGSNLTR(SEC ID N°: 269) VRHNLTR(SEC ID N°: 270)
GCA	DKAQLGR(SEC ID N°: 271) DRSALSR(SEC ID N°: 272) DRSOLAR(SEC ID N°: 273) ERGTLAR(SEC ID N°: 274) HNGTLKR(SEC ID N°: 275) KNTRLRV(SEC ID N°: 276) LKHSLRR(SEC ID N°: 277) LNHTLKR(SEC ID N°: 278) LRHSLRR(SEC ID N°: 279) QDNTLRR(SEC ID N°: 280) QDVSLVR(SEC ID N°: 281) QGGTLRR(SEC ID N°: 282) QGNLTLR(SEC ID N°: 283) QKGTLLGR(SEC ID N°: 284) QNGTLTR(SEC ID N°: 285)	QPNTLTR(SEC ID N°: 286) QRGTLNR(SEC ID N°: 287) QSGDLRR(SEC ID N°: 288) QSGDLTR(SEC ID N°: 289) QSGSLTR(SEC ID N°: 290) QSNVLSR(SEC ID N°: 291) QSTTLKR(SEC ID N°: 292) QTATLKR(SEC ID N°: 293) QTNTLKR(SEC ID N°: 294) RGQELRR(SEC ID N°: 295) RRQELHR(SEC ID N°: 296) RRQELKR(SEC ID N°: 297) RRQELTR(SEC ID N°: 298) RRVDLLR(SEC ID N°: 299) SPEQLAR(SEC ID N°: 300)
GCC	DCRDLAR(SEC ID N°: 301) DGSTLNR(SEC ID N°: 302) DGSTLRR(SEC ID N°: 303) DHSNLSR(SEC ID N°: 304)	DSPTLRR(SEC ID N°: 313) DSSVLRR(SEC ID N°: 314) EHRGLKR(SEC ID N°: 315) ERGTLLR(SEC ID N°: 316)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	DKSCENR(SEC ID N°: 305)	ERRGLAR(SEC ID N°: 317)
	DKSVLAR(SEC ID N°: 306)	ERRGLDR(SEC ID N°: 318)
	DPSNLRR(SEC ID N°: 307)	KRRDLDR(SEC ID N°: 319)
	DPSILRR(SEC ID N°: 308)	LKKDLLR(SEC ID N°: 320)
	DRRTLDR(SEC ID N°: 309)	SHTVLTR(SEC ID N°: 321)
	DRSDLTR(SEC ID N°: 310)	SKKSLTR(SEC ID N°: 322)
	DRSSLTR(SEC ID N°: 311)	SNKDLTR(SEC ID N°: 323)
	DRSSRTK(SEC ID N°: 312)	VRKDLTR(SEC ID N°: 324)
GCG	KADTLVR(SEC ID N°: 325)	RRHTLTR(SEC ID N°: 343)
	KHDTLRR(SEC ID N°: 326)	RRLTLLR(SEC ID N°: 344)
	KNNDLTR(SEC ID N°: 327)	RSDDLQR(SEC ID N°: 345)
	RADTLRR(SEC ID N°: 328)	RSDDLTR(SEC ID N°: 346)
	RAHTLRR(SEC ID N°: 329)	RSDDLVR(SEC ID N°: 347)
	REDSLPR(SEC ID N°: 330)	RSDELNR(SEC ID N°: 348)
	RHAALLS(SEC ID N°: 331)	RSDELQR(SEC ID N°: 349)
	RKDGLTR(SEC ID N°: 332)	RSDELSR(SEC ID N°: 350)
	RKGGLDR(SEC ID N°: 333)	RSDELTR(SEC ID N°: 351)
	RKGLLR(SEC ID N°: 334)	RSDEKRR(SEC ID N°: 352)
	RLDMLAR(SEC ID N°: 335)	RSDLSLK(SEC ID N°: 353)
	RLRDLPR(SEC ID N°: 336)	RSDTLKK(SEC ID N°: 354)
	RNLTLAR(SEC ID N°: 337)	RSDVLTR(SEC ID N°: 355)
	RNLTLVR(SEC ID N°: 338)	RSNTLLR(SEC ID N°: 356)
	RPDGLAR(SEC ID N°: 339)	RTDLLRR(SEC ID N°: 357)
	RRDDLTR(SEC ID N°: 340)	RTDSLPR(SEC ID N°: 358)
	RRDGLTR(SEC ID N°: 341)	RTDTLAR(SEC ID N°: 359)
	RRHGLDR(SEC ID N°: 342)	RVDDLGR(SEC ID N°: 360)
GCT	ARSTRTT(SEC ID N°: 361)	QSSDLRR(SEC ID N°: 377)
	EGSGLKR(SEC ID N°: 362)	QSSDLNR(SEC ID N°: 378)
	GATAKKR(SEC ID N°: 363)	QSSDLTR(SEC ID N°: 379)
	KHQFLQR(SEC ID N°: 364)	THSMLAR(SEC ID N°: 380)
	LKHDLRR(SEC ID N°: 365)	TKPILVR(SEC ID N°: 381)
	LRASLRR(SEC ID N°: 366)	TKQILGR(SEC ID N°: 382)
	LROTLAR(SEC ID N°: 367)	TKQVLDR(SEC ID N°: 383)
	LRTSLVR(SEC ID N°: 368)	TSGELVR(SEC ID N°: 384)
	MKNTLTR(SEC ID N°: 369)	TSSGLTR(SEC ID N°: 385)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	NGOGLRR (SEC ID N°: 370)	TTQALRR (SEC ID N°: 386)
	NKOALDR (SEC ID N°: 371)	VGASLKR (SEC ID N°: 387)
	NRSDLTR (SEC ID N°: 372)	VGNSLTR (SEC ID N°: 388)
	ORQALDR (SEC ID N°: 373)	VKNLTLTR (SEC ID N°: 389)
	ORSDLHR (SEC ID N°: 374)	VRQGLTR (SEC ID N°: 390)
	ORSDLTR (SEC ID N°: 375)	VSNSLAR (SEC ID NO: 391)
	OSSDLQR (SEC ID N°: 376)	VSNTLTR (SEC ID NO: 392)
GGA	DKTKLNV (SEC ID N°: 393)	QSQHLVR (SEC ID N°: 409)
	DKTKLRV (SEC ID N°: 394)	QSTHLTR (SEC ID N°: 410)
	DNAHLAR (SEC ID N°: 395)	QTTHLRR (SEC ID N°: 411)
	QANHLSR (SEC ID N°: 396)	QTTHLSR (SEC ID N°: 412)
	QGGHLKR (SEC ID N°: 397)	QTTHLSR (SEC ID N°: 413)
	QHSHLVR (SEC ID N°: 398)	QVSHLTR (SEC ID N°: 414)
	QKPHLSR (SEC ID N°: 399)	RMERLDR (SEC ID N°: 415)
	QMSHLKR (SEC ID N°: 400)	RPAKLV (SEC ID N°: 416)
	QNSHLRR (SEC ID N°: 401)	RPSKLV (SEC ID N°: 417)
	QNSHLRR (SEC ID N°: 402)	RRDHRTT (SEC ID N°: 418)
	QRAHLER (SEC ID N°: 403)	RSTHLRV (SEC ID N°: 419)
	QRAHLIR (SEC ID N°: 404)	RTDRLIR (SEC ID N°: 420)
	QSAHLKR (SEC ID N°: 405)	THAHLTR (SEC ID N°: 421)
	QSGHLAR (SEC ID N°: 406)	TSAHLAR (SEC ID N°: 422)
	QSGHLQR (SEC ID N°: 407)	YNTHLTR (SEC ID N°: 423)
	QSGHLSR (SEC ID N°: 408)	
GGC	AKSKLDR (SEC ID N°: 424)	KNHSLNN (SEC ID N°: 437)
	APSKLDR (SEC ID N°: 425)	KNVSLTH (SEC ID N°: 438)
	DGGHLTR (SEC ID N°: 426)	LKEHLTR (SEC ID N°: 439)
	DKSHLPR (SEC ID N°: 427)	QSSHLAR (SEC ID N°: 440)
	DPGHLVR (SEC ID N°: 428)	SKHKLER (SEC ID N°: 441)
	DRSHLAR (SEC ID N°: 429)	SPSKLAR (SEC ID N°: 442)
	DRSHLSR (SEC ID N°: 430)	SPSKLVR (SEC ID N°: 443)
	DRSHLTR (SEC ID N°: 431)	TNSKLTR (SEC ID N°: 444)
	EKSHLKR (SEC ID N°: 432)	TPSKLDR (SEC ID N°: 445)
	EKSHLTR (SEC ID N°: 433)	TRAKLHI (SEC ID N°: 446)
	ENSKLNR (SEC ID N°: 434)	VPSKLAR (SEC ID N°: 447)
	ESGHLKR (SEC ID N°: 435)	VPSKLKR (SEC ID N°: 448)
	ESGHLRR (SEC ID N°: 436)	VPSKLLR (SEC ID N°: 449)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
GGG	KGDHLRR (SEC ID N°: 450)	RNTHLAR (SEC ID N°: 464)
	KKDHLHR (SEC ID N°: 451)	RQGHLKR (SEC ID N°: 465)
	KRERLDR (SEC ID N°: 452)	RR AHLQN (SEC ID N°: 466)
	KRERLER (SEC ID N°: 453)	RREHLVR (SEC ID N°: 467)
	KSNHLHV (SEC ID N°: 454)	RRSHLTR (SEC ID N°: 468)
	RTSHLRA (SEC ID N°: 455)	RSAHLAR (SEC ID N°: 469)
	RGDKLAL (SEC ID N°: 456)	RSAHLNR (SEC ID N°: 470)
	RGDKLGP (SEC ID N°: 457)	RSDHLAR (SEC ID N°: 471)
	RGNHLRR (SEC ID N°: 458)	RSDHLSK (SEC ID N°: 472)
	RIDKLGG (SEC ID N°: 459)	RSDHLSR (SEC ID N°: 473)
	RKHHLGR (SEC ID N°: 460)	RSDHLTR (SEC ID N°: 474)
	RKHRLDG (SEC ID N°: 461)	RSDKLNK (SEC ID N°: 475)
	RNDKLVP (SEC ID N°: 462)	RSDKLVR (SEC ID N°: 476)
	RNHGLVR (SEC ID N°: 463)	RTEHLAR (SEC ID N°: 477)
GGT	DSSKLSR (SEC ID N°: 478)	RRQKLT (SEC ID N°: 493)
	EAHHLNR (SEC ID N°: 479)	RRSRLVR (SEC ID N°: 494)
	HGHRLKT (SEC ID N°: 480)	RSDHLST (SEC ID N°: 495)
	IPNHLAR (SEC ID N°: 481)	RSDHLTT (SEC ID N°: 496)
	IRHHLKR (SEC ID N°: 482);	TKQKLQT (SEC ID N°: 497)
	LTQGLRR (SEC ID N°: 483)	TKQRLEV (SEC ID N°: 498)
	MGHHLKR (SEC ID N°: 484)	TRQKLET (SEC ID N°: 499)
	MKHHLAR (SEC ID N°: 485)	TRTRLVI (SEC ID N°: 500)
	MKHHLDA (SEC ID N°: 486)	TSGHLNR (SEC ID N°: 501)
	MSDHLNR (SEC ID N°: 487)	TSGHLVR (SEC ID N°: 502)
	MSHHLNR (SEC ID N°: 488)	TTTKLAI (SEC ID N°: 502)
	QPHHLPR (SEC ID N°: 489)	VDHHLRR (SEC ID N°: 504)
	QSSHLAR (SEC ID N°: 490)	VKHGLGR (SEC ID N°: 505)
	QSSHLTR (SEC ID N°: 494)	VKHGLTR (SEC ID N°: 506)
	RQSRLQR (SEC ID N°: 492)	WPSNLTR (SEC ID N°: 507)
GTA	QGGALQR (SEC ID N°: 509)	YNWHLQR (SEC ID N°: 508)
	QGTSLAR (SEC ID N°: 510)	QRSSLVR (SEC ID N°: 520)
	QKQALDR (SEC ID N°: 511)	QSGALAR (SEC ID N°: 521)
	QKQALTR (SEC ID N°: 512)	QSGALTR (SEC ID N°: 522)
	QKVSLKR (SEC ID N°: 513)	QSGSLTR (SEC ID N°: 523)
		QSGTLTR (SEC ID N°: 524)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	QMNALQR (SEC ID N°: 514) QQQALKR (SEC ID N°: 515) QQQALTR (SEC ID N°: 516) QQQALVR (SEC ID N°: 517) QQSSLLR (SEC ID N°: 518) QRASLTR (SEC ID N°: 519)	QSSSLIR (SEC ID N°: 525) QSSSLVR (SEC ID N°: 526) QSSTLTR (SEC ID N°: 527) QSTSLQR (SEC ID N°: 528) TSSARTT (SEC ID N°: 529)
GTC	APSSLRR (SEC ID N°: 530) DATQLVR (SEC ID N°: 531) DHSSLKR (SEC ID N°: 532) DPGALVR (SEC ID N°: 533) DPTSLNR (SEQIDNO: 534) DRSALAR (SEC ID N°: 535) DRSALSR (SEC ID N°: 536) DRSSLRR (SEC ID N°: 537) DRTPLNR (SEC ID N°: 538) DRTPLQN (SEC ID N°: 539) DRTSLAR (SEC ID N°: 540) EGGALRR (SEC ID N°: 541)	ESGALRR (SEC ID N°: 542) NTSLLRR (SEC ID N°: 543) RSDVLSE (SEC ID N°: 544) TGAVLRR (SEC ID N°: 545) TGAVLTR (SEC ID N°: 546) TKKILTV (SEC ID N°: 547) TKSLLAR (SEC ID N°: 548) TMAVLRR (SEC ID N°: 549) TRAVLRR (SEC ID N°: 550) TSTILAR (SEC ID N°: 551) TSTLLKR (SEC ID N°: 552) TSTLLNR (SEC ID N°: 553)
GTG	RASVLDI (SEC ID N°: 554) RGDALAR (SEC ID N°: 555) RHTSLTR (SEC ID N°: 556) RKDALHV (SEC ID N°: 557) RKHILIH (SEC ID N°: 558) RKTALNR (SEC ID N°: 559) RNFILAR (SEC ID N°: 560) RNFILQR (SEQIDNO: 561) RNFVLAR (SEC ID N°: 562) RNTALQH (SEC ID N°: 563) RNVALGN (SEC ID N°: 564) RNYNLVT (SEC ID N°: 565) RPDALPR (SEC ID N°: 566) RRAALGP (SEC ID N°: 567) RREVLEN (SEC ID N°: 568)	RRFILSR (SEC ID N°: 569) RRHILDR (SEC ID N°: 570) RSAALSR (SEC ID N°: 571) RSDALAR (SEC ID N°: 572) RSDALRT (SEC ID N°: 573) RSDALSR (SEC ID N°: 574) RSDALTR (SEC ID N°: 575) RSEDLVR (SEC ID N°: 576) RSHILTN (SEC ID N°: 577) RTSSLKR (SEC ID N°: 578) RTVALNR (SEC ID N°: 579) SRFTLGR (SEQ DO NO: 580) SRFTLGR (SEC ID N°: 581) VSSSLRR (SEC ID N°: 582)
GTT	AATALRR (SEC ID N°: 583) HHNSLTR (SEC ID N°: 584) HKSSLTR (SEC ID N°: 585)	TKPVLKI (SEC ID N°: 595) TRHSLGR (SEC ID N°: 598) TSGALTR (SEC ID N°: 599)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	HSSSLVR (SEC ID N°: 586)	TSGSLTR (SEC ID N°: 600)
	IKALLTR (SEC ID N°: 587)	TSGSLVR (SEC ID N°: 601)
	INHSLRR (SEC ID N°: 588)	TSTLLKR (SEC ID N°: 602)
	IRTSLEKR (SEC ID N°: 589)	TSTRLDI (SEC ID N°: 603)
	MNSVLKR (SEC ID N°: 590)	TTALLKR (SEC ID N°: 604)
	MTSSLRR (SEC ID N°: 591)	TTSALTR (SEC ID N°: 605)
	QATLLRR (SEC ID N°: 592)	TTTVLAR (SEC ID N°: 606)
	QSSALTR (SEC ID N°: 593)	VGGSLNR (SEC ID N°: 607)
	THTVLAR (SEC ID N°: 594)	
TAA	QGGNLAL (SEC ID N°: 608)	QQGNLRN (SEC ID N°: 611)
	QGGNLTL (SEC ID N°: 609)	QRGNLNM (SEC ID N°: 612)
	QGGNLQL (SEC ID N°: 610)	QSGNLHT (SEC ID N°: 613)
TAC	NSDHLTN (SEC ID N°: 614)	
TAG	QGYNLAG (SEC ID N°: 615)	RPESLAP (SEC ID N°: 625)
	RAHNLL (SEC ID N°: 616)	RPESLRP (SEC ID N°: 626)
	REDNLHT (SEC ID N°: 617)	RRDGLAG (SEC ID N°: 627)
	RGHNLLV (SEC ID N°: 618)	RRDHLSL (SEC ID N°: 628)
	RGTNLRT (SEC ID N°: 619)	RRDHLSP (SEC ID N°: 629)
	RHDGLAG (SEC ID N°: 620)	RRDNLPK (SEC ID N°: 630)
	RIDHLVP (SEC ID N°: 621)	RRRNLOI (SEC ID N°: 631)
	RKTGLLI (SEC ID N°: 622)	RSHNLKL (SEC ID N°: 632)
	RLDGLAG (SEC ID N°: 623)	RSHNLRL (SEC ID N°: 633)
	RPEGLST (SEC ID N°: 624)	TSSNRKK (SEC ID N°: 634)
TCA	QSADRTK (SEC ID N°: 635)	
TCC	DKRSLPH (SEC ID N°: 636)	
TCG	ASSTRTK (SEC ID N°: 637)	RMDSLGG (SEC ID N°: 644)
	HSSDLTR (SEC ID N°: 638)	RRDGLSG (SEC ID N°: 645)
	KNNDLLK (SEC ID N°: 639)	RSDELRT (SEC ID N°: 646)
	NRSDLSR (SEC ID N°: 640)	RSDDLGR (SEC ID N°: 647)
	QSSDLSK (SEC ID N°: 641)	RSDTLPA (SEC ID N°: 648)
	RADGLQL (SEC ID N°: 642)	RSDTLPL (SEC ID N°: 649)
	RGDSLKK (SEC ID N°: 643)	RSSDLSR (SEC ID N°: 650)
		RTDSLQP (SEC ID N°: 651)
TCT	NNRDRTK (SEC ID N°: 652)	SKPNLKM (SEC ID N°: 654)

Triplete	Hélice de reconocimiento (SEC ID N°:)	
	QRNTLKG (SEC ID N°: 653)	
TGA	QAGHLAS (SEC ID N°: 655)	QSGHLTK (SEC ID N°: 657)
	QREHLTT (SEC ID N°: 656)	
TGC	ANRTL VH (SEC ID N°: 658)	RRRN LHL (SEC ID N°: 669)
	QARSLRA (SEC ID N°: 659)	RRRN LTL (SEC ID N°: 670)
	QGRSLRA (SEC ID N°: 660)	RSRN LDI (SEC ID N°: 671)
	QNRSLAH (SEC ID N°: 661)	RSRN LLL (SEC ID N°: 672)
	QQRSLKN (SEC ID N°: 662)	RSRN LTL (SEC ID N°: 673)
	QRRSLGH (SEC ID N°: 663)	
	RARN LTL (SEC ID N°: 664)	
	RGRN LEM (SEC ID N°: 665)	
	RKRN LIM (SEC ID N°: 666)	
	RMRN LII (SEC ID N°: 667)	
	RNRN LVL (SEC ID N°: 668)	
TGG	RMDHLAG (SEC ID N°: 674)	RSDHLSL (SEC ID N°: 679)
	RNAHRJN (SEC ID N°: 675)	RSDHLST (SEC ID N°: 680)
	RRDHLSL (SEC ID N°: 676)	RSDHLTT (SEC ID N°: 681)
	RREHLTI (SEC ID N°: 677)	RTESLHI (SEC ID N°: 682)
	RSDHLRE (SEC ID N°: 678)	
TGT	KROHLEY (SEC ID N°: 683)	QQHGLRH (SEC ID N°: 691)
	QAHGLTA (SEC ID N°: 684)	QRHGLSS (SEC ID N°: 692)
	QAHGLTG (SEC ID N°: 685)	RHQHLKL (SEC ID N°: 693)
	QPGHLTA (SEC ID N°: 686)	RKQHLQL (SEC ID N°: 694)
	QPHGLAH (SEC ID N°: 687)	RKQHLTL (SEC ID N°: 695)
	QPHGLGA (SEC ID N°: 688)	RKQHLVL (SEC ID N°: 696)
	QPHGLRA (SEC ID N°: 689)	RRQALEY (SEC ID N°: 697)
	QPHGLRH (SEC ID N°: 690)	RRQHLQY (SEC ID N°: 698)
TTA	QQTGLNV (SEC ID N°: 699)	
TTC	QRNALRG (SEC ID N°: 700)	RANHLTI (SEC ID N°: 701)
TTG	RADALMV (SEC ID N°: 702)	RSDSL SA (SEC ID N°: 703)
TTT	HSNARKT (SEC ID N°: 704)	QRNALSG (SEC ID N°: 705)

En una realización, el dominio catalítico de endonucleasa está unido a un dedo de cinc en el que las al menos 10 hélices de reconocimiento, seleccionadas de manera independiente, son todas diferentes. En determinadas realizaciones, será deseable incluir hélices de reconocimiento diferentes para un triplete de pares de bases repetido en el sitio de ablación. En otras realizaciones, las hélices de reconocimiento para cualquiera de los tripletes repetidos son iguales. Por ejemplo, 0, 1, 2 o 3 de las hélices de reconocimiento seleccionadas son iguales.

En determinadas realizaciones, un vector basado en VAA contiene dos o más sitios de ablación de endonucleasa que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Estos sitios de ablación de endonucleasa pueden modificarse por ingeniería genética en el vector en diversas configuraciones. Más particularmente, un vector VAA que lleva un gen

de interés (GOI, por *gene of interest*) se modifica por ingeniería genética para que contenga al menos un sitio de ablación en posición 5' con respecto a la cadena codificante del gen de interés. Cuando el vector contiene dos o más sitios de ablación, el segundo sitio de ablación puede localizarse: en posición 3' con respecto al gen de interés en orientación en sentido; en posición 3' con respecto al gen de interés en orientación inversa; dos sitios de ablación pueden localizarse en posición 5' con respecto al gen de interés, uno en orientación en sentido y el otro en orientación inversa, o ambos en orientación en sentido; o el vector puede contener uno o dos sitios de ablación en posición 5' con respecto al gen de interés (uno en orientación en sentido y otro en orientación inversa o ambos en orientación en sentido) y dos sitios de ablación en posición 3' con respecto al gen de interés (uno en orientación en sentido y uno en dirección inversa o ambos en orientación en sentido).

Cuando dos sitios de ablación se localizan de tal manera que no interviene un gen de interés, es decir, dos sitios de ablación en posición 5' o dos en posición 3', los sitios de ablación pueden separarse con un espaciador. Puede seleccionarse cualquier espaciador adecuado y la secuencia espaciadora puede ser una secuencia no codificante. En otra realización, la secuencia espaciadora puede ser un gen indicador, un transgén o un gen de interés.

En una realización, cuando una composición de la invención contiene más de un sitio de ablación, los sitios de ablación son iguales. En otra realización, cuando una composición o un sistema basado en vectores de la invención contienen más de un sitio de ablación, cada sitio es diferente del otro y cada uno de ellos se dirige de manera específica y selectiva mediante una endonucleasa quimérica diferente.

En los ejemplos de trabajo indicados a continuación, se ilustra un ablacionador codificado por la secuencia: 10xZF-FokI_Cat secuencia de nucleótidos: SEC ID N°: 59:

ATGGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCTGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCCAG
AGAAGAAGCCTGGGCCACCACCAGCGTACGCACCCCGGCGAGAAACCTTAT
AAGTGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTTCAGCAAGAAGAACGACCTGACCCGG
CACCAGCGGACACACCCCGGGGAAAAGCCATACAAATGTCCAGAGTGTGGG
AAGTCTTTCTCCAGCCGGCGGACCTGCAGAGCCCATCAGAGAACACATACCG
GGGAGAAGCCTTTCCAGTGCCGGATCTGCATGAGAACTTCAGCGTGCGGCA
CAACCTGACCAGACACCTGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCCTTTCAGTGC
AGAATCTGTATGCGGAACTTCTCCGACCGGACCAGCCTGGCCCGGCATCTGA
GAACTCATCCTGGGGAAAAGCCCTATAAGTGTCCAGAATGCGGGAAATCCTT
TAGCGACAGCGGCAACCTGCGGGTGCACCAGAGGACTCATCCAGGCGAGAA
ACCCTACAAATGCCCCGAATGCGGAAAGTCATTCTCCACACCGGCCATCTG
CTCGAGCATCAGCGGACCCACACTGGGGAGAAACCATTTTCAGTGTGCGATCT
GTATGAGGAATTTTCAGCACCAACCAGGCCCTGGGCGTGACCTGAGAACAC
ACCCAGGCGAGAAGCCTTACAAGTGTCCAGAGTGCGGAAAGTCATTTTCCGT
GCGCCACAATCTGACACGGCATCAGCGCACCCATCCCGGCGAGAAGCCTTAC
AAATGCCCCGAGTGTGGCAAATCTTTTCAGTGACCGGACCTCTCTGGCCAGAC
ATCAGAGGACACACGGCACTAGTGGCAAGCAGCTGGTGAAAAGCGAGCTGG
AAGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAATACGTGCCCCACGAGT
ACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACCCACCCAGGACAGAATCCTGG
AAATGAAGGTCATGGAATTTTTTCATGAAGGTGTACGGCTACCGGGGCGAGCA
CCTGGGCGGCAGCAGAAAACCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCAGCCC
CATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAA
CCTGCCCATCGGACAGGCCGACGAGATGCAGAGATACGTGGAAGAGAACCA
GACCCGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCAG
CAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAAC
TACAAGGCCCAGCTGACCCGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCTG
TGCTGAGCGTGGAAGAAGTGTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCA
CCCTGACCCTGGAAGAAGTGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACT
TCTGATAG.

El ablacionador ilustrativo transcrito tiene la secuencia: 10xZF-FokI_Cat secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 60:

MGEKPYKCPECGKSFSQRRSLGHHQORTHHPGEKPYKCPECGKSFSKKNLLRHQ
THPGEKPYKCPECGKSFSRRTCRAHQORTHTGEKPFQCRICMRNFSVRHNLTRH
LRTHTGEKPFQCRICMRNFSDRTSLARHLRTHHPGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRV
HQORTHHPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQORTHTGEKPFQCRICMRNFSTNQAL
GVHLRTHHPGEKPYKCPECGKSFSVRHNLTRHQTHPGEKPYKCPECGKSFSDRT
 SLARHQORTH - GTSGKQLVKSELEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNPTQDR I
 LEMKVMEFFMKVYGYRGEHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYS GGYN
 LPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYK
 AQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF.

En una realización adicional, el ablacionador se modifica por ingeniería genética de tal manera que esté controlado por un casete que está activado por un factor de transcripción después de dimerizarse por un agente farmacológico, tal como se describe con detalle en esta memoria descriptiva y se incorpora en el presente documento por referencia. Típicamente, este casete comprende dos unidades de transcripción. Una de las dos unidades de transcripción codifica el dominio de unión a ADN del factor de transcripción fusionado con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un primer promotor; y una segunda de las dos unidades de transcripción codifica el dominio de activación del factor de transcripción fusionado con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un segundo promotor. Como se describe con más detalle en cualquier parte en la memoria descriptiva y se incorpora en el presente documento, el primer promotor y el segundo promotor se seleccionan independientemente de un promotor constitutivo y un promotor inducible. En una realización, tanto el primer como el segundo promotor son promotores constitutivos y el agente farmacológico es un dimerizador que dimeriza los dominios del factor de transcripción. En otra realización, uno del primer promotor y el segundo promotor es un promotor inducible. Opcionalmente, las dos unidades de transcripción son una unidad bicistrónica que contiene un IRES o furina-2A. En cualquier parte de la memoria descriptiva se describen diversos elementos genéticos y métodos adecuados para la construcción de vectores y se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización adicional, el promotor está controlado por un sistema regulable por rapamicina y el agente farmacológico es rapamicina o un rapálogo.

Esta realización, puede generarse usando la secuencia de ácido nucleico (de al menos 30 pb) exclusiva en el sitio de reconocimiento de ablación y la endonucleasa quimérica que contiene al menos 10x dedos de cinc, como se describe en el presente documento y en otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Métodos para generar las composiciones de virus con replicación defectuosa

Se han establecido muchos métodos para la producción eficiente de VAA recombinantes (VAAr) que empaquetan un transgén - estas pueden usarse o adaptarse para generar las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención. En un sistema, una línea celular productora se transfecta de manera transitoria con una construcción que codifica el transgén flanqueado por las ITR (repeticiones terminales invertidas) y una o más construcciones que codifican los genes rep y cap. En un segundo sistema, una línea celular de empaquetamiento que proporciona de manera estable los genes rep y cap se transfecta de manera transitoria con una construcción que codifica el transgén flanqueado por las ITR. En un tercer sistema, se usa una línea celular estable que proporciona el transgén flanqueado por las ITR y rep/cap. Un método para minimizar la posibilidad de generar VAA con replicación competentes (VAArc) usando estos sistemas es eliminando regiones de homología entre regiones que flanquean el casete rep/cap y las ITR que flanquean el transgén. Sin embargo, en cada uno de estos sistemas, los viriones de VAA se producen en respuesta a infección con adenovirus o herpesvirus auxiliares, que requieren la separación de los VAAr de los virus contaminantes.

Más recientemente, se han desarrollado sistemas que no requieren infección con virus auxiliar para recuperar el VAA - el sistema también proporcionan las funciones auxiliares necesarias (es decir, adenovirus E1, E2a, VA y E4 o herpesvirus UL5, UL8, UL52 y UL29 y herpesvirus polimerasa), en *trans*. En estos sistemas novedosos, las funciones auxiliares pueden proporcionarse mediante transfección transitoria de las células con construcciones que codifican las funciones auxiliares necesarias, o las células pueden modificarse por ingeniería genética para que contengan, de manera estable, genes que codifiquen las funciones auxiliares, cuya expresión puede controlarse a nivel transcripcional o post-transcripcional. En otro sistema más, el transgén flanqueado por las ITR y los genes de rep/cap, se introducen en células de insecto por infección con vectores basados en baculovirus. Para una revisión de

estos sistemas de producción, véase en líneas generales, por ejemplo, Grieger y Samulski, 2005; y Btining et al., 2008; Zhang et al., 2009, "Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20: 922-929, incorporándose el contenido de cada una de estas referencias en el presente documento en su totalidad. Métodos para preparar y usar estos y otros sistemas de producción de VAA también se describen en las siguientes patentes de Estados Unidos: 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823 y 7.439.065 cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Véanse también los párrafos indicados más adelante, que describen métodos para graduar la producción de VAA usando estos sistemas y sus variantes.

Debido a limitaciones de tamaño de los VAA para el empaquetamiento (tolerando un transgén de aproximadamente 4,5 kb), puede ser necesario que las unidades de transcripción (es decir, la unidad transgénica, la unidad de ablación y la unidad del factor de transcripción dimerizable) descritas, se modifiquen por ingeniería genética y se empaqueten en dos o más reservas de VAA con replicación defectuosa. Esto puede ser preferible, porque existen pruebas de que un exceso de la capacidad de empaquetamiento puede conducir a la generación de un mayor número de partículas de VAA "vacías".

Como alternativa, el espacio disponible para el empaquetamiento puede conservarse combinando más de una unidad de transcripción en una sola construcción, reduciendo de este modo la cantidad de espacio necesario de la secuencia reguladora. Por ejemplo, un solo promotor puede dirigir la expresión de un solo ARN que codifica dos o tres o más genes de interés, y la traducción de los genes aguas abajo se dirige mediante secuencias de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). En otro ejemplo, un solo promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contiene, en una sola fase de lectura abierta (ORF), dos o tres o más genes de interés separados entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (por ejemplo, T2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (por ejemplo, furina). Por tanto, la ORF codifica una sola poliproteína, que, bien durante (en el caso de T2A) o después de la traducción, se escinde en las proteínas individuales (tales como, por ejemplo, un transgén y un factor de transcripción dimerizable). Sin embargo, debe observarse, que aunque estos sistemas de IRES y de poliproteína pueden usarse para ahorrar espacio de empaquetamiento de VAA, estos solo pueden usarse para la expresión de componentes que pueden estar dirigidos por el mismo promotor.

En otra alternativa, la capacidad del transgén de VAA puede aumentarse proporcionando las ITR de VAA de dos genomas que pueden hibridarse para formar concatámeros de cabeza a cola. Generalmente, después de la entrada del VAA en la célula hospedadora, el ADN monocatenario que contiene el transgén se convierte, a través de complejos de ADN polimerasa de la célula hospedadora, en ADN bicatenario, después de lo cual las ITR ayudan en la formación de concatámeros en el núcleo. Como una alternativa, el VAA puede modificarse por ingeniería genética para que sea un VAA autocomplementario (ac), lo que permite que el virus evite la etapa de síntesis de segunda cadena después de la entrada en una célula diana, proporcionando un virus VAAac con una expresión transgénica más rápida y, posiblemente, más alta (por ejemplo, de hasta 100 veces). Por ejemplo, el VAA puede modificarse por ingeniería genética para que tenga un genoma que comprenda dos ADN monocatenarios conectados que codifiquen, respectivamente, una unidad transgénica y su complemento, que puedan encajar entre sí después de la administración en una célula diana, produciendo un ADN bicatenario que codifique la unidad transgénica de interés. Los VAA autocomplementarios se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6596.535; 7.125.717; y 7.456.683, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La unidad (o unidades) de transcripción en los VAAr con replicación defectuosa pueden empaquetarse con una proteína capsidial (Cap) de VAA descrita en el presente documento, conocida en la técnica, o por descubrir. Las proteínas Cap de los serotipos VAA1, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9 o rh10 se prefieren particularmente para generar los VAAr para su uso en sujetos humanos. En una realización preferida, una Cap de VAAr está basada en el serotipo VAA8. En otra realización, una Cap de VAAr está basada en proteínas Cap de dos o tres o más serotipos de VAA. Por ejemplo, en una realización, una Cap de VAAr está basada en VAA6 y VAA9.

Se ha publicado que las proteínas Cap tienen efectos sobre el tropismo del hospedador, la especificidad de células, tejidos u órganos, el uso de receptores, la eficiencia de infección e inmunogenicidad de los virus VAA. Véase, por ejemplo Grieger y Samulski, 2005; Buning et al., 2008; y las referencias citadas más adelante en esta subsección, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad. Por consiguiente, puede seleccionarse una proteína Cap de VAA para su uso en un VAAr teniendo en cuenta, por ejemplo, el sujeto que vaya a tratarse (por ejemplo, un ser humano o no humano, el estado inmunológico del sujeto, la idoneidad del sujeto para un tratamiento corto o prolongado, etc.) o una aplicación terapéutica particular (por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad o trastorno particular, o la administración a células, tejidos u órganos particulares).

En algunas realizaciones, una Cap de VAAr se selecciona con respecto a su capacidad para transducir eficazmente una célula, tejido u órgano particular, por ejemplo, a la cual se dirige una terapia particular. En algunas realizaciones, una Cap de VAAr se selecciona por su capacidad para atravesar una barrera celular endotelial estrecha, por ejemplo, la barrera hematoencefálica, la barrera hematocular, la barrera hematotesticular, la barrera hematoovárica, la barrera celular endotelial que envuelve el corazón o la barrera hematoplacentaria.

La especificidad tisular de los serotipos de los virus adenoasociados (VAA) se determina por el serotipo de la cápside y el vector viral puede generarse en función de las diferentes cápsides del VAA teniendo en cuenta su capacidad para infectar diferentes tejidos. El VAA2 presenta un tropismo natural hacia músculo esquelético, neuronas del sistema nervioso central, células de la musculatura lisa vascular. Se ha descrito que la transducción del VAA1 es más eficaz que la del VAA2 en músculo, articulaciones artríticas, islotes pancreáticos, corazón, endotelio vascular, sistema nervioso central (SNC) y hepatocitos, mientras que el VAA3 parece ser más idóneo para la transducción de células pilosas internas de la cóclea, VAA4 para cerebro, VAA5 para SNC, pulmón, ojos, articulaciones artríticas y hepatocitos, VAA6 para músculo, corazón y epitelio de las vías respiratorias, VAA7 para músculo, VAA8 para músculo, páncreas, corazón e hígado, y VAA9 para corazón. Véase, por ejemplo, Buning et al., 2008. Como una fuente para la cápside de VAAr puede usarse cualquier serotipo de VAA conocido en la técnica, por ejemplo, los serotipos VAA1, VAA2, VAA3A, VAA3B, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7 [véase el documento WO 2003/042397], VAA8 [véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 7790449; la patente de Estados Unidos Nº 7282199], VAA9 [véase, el documento WO 2005/033321], VAA10, VAA11, VAA12, rh10, VAA modificado [véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110689], o aún por descubrir, o un VAA recombinante basado en estos.

Diversos VAA de origen natural y recombinante, sus ácidos nucleicos codificantes, proteínas Cap y Rep de VAA y sus secuencias, así como métodos para aislar o generar, propagar y purificar dichos VAA, y en particular, sus cápsides, adecuados para su uso en la producción de VAAr se describen en Gao et al., 2004, "Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues," J. Virol. 78:6381-6388; en las patentes de Estados Unidos Nos 7.319.002; 7.056.502; 7.282.199; 7.198.951; 7.235.393; 6.156.303; y 7.220.577; en las publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº US 2003-0138772; US 2004-0052764; US 2007-0036760; US 2008-0075737; y US 2008-0075740; y en la publicación de solicitud de Patente Internacional Nos WO 20031014367; WO 20011083692; WO 2003/042397 (VAA7 y diversos VAA de simio); en los documentos WO 2003/052052; WO 2005/033321; WO 20061110689; WO 2008/027084; y WO 2007/127264; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, puede generarse una Cap de VAA para su uso en el VAAr por mutagénesis (por ejemplo, mediante inserciones, delecciones o sustituciones) de una de las Cap de VAA mencionadas anteriormente o de su ácido nucleico codificante. En algunas realizaciones, una Cap de VAA es al menos 70 % idéntica, 75 % idéntica, 80 % idéntica, 85 % idéntica, 90 % idéntica, 95 % idéntica, 98 % idéntica o 99 % idéntica, o más, a una o más de las Cap de VAA mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, la Cap de VAA es quimérica, que comprende dominios de dos o tres o cuatro o más de las Cap de VAA mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, la Cap de VAA es un mosaico de monómeros de Vp1, Vp2 y Vp3 de dos o tres diferentes VAA o VAA recombinantes. En algunas realizaciones, una composición de VAAr comprende más de una de las Cap mencionadas anteriormente.

En algunas realizaciones, una Cap de VAA para su uso en una composición de VAAr se modifica por ingeniería genética para que contenga una secuencia heteróloga u otra modificación. Por ejemplo, una secuencia peptídica o de proteína que confiere direccionamiento selectivo o evasión inmunitaria puede modificarse por ingeniería genética en una proteína Cap. Como alternativa o además, la proteína Cap puede modificarse químicamente de tal manera que la superficie del VAAr esté unida a polietilenglicol (PEGilada), lo que puede facilitar la evasión inmunitaria. La proteína Cap también puede mutagenizarse, por ejemplo, para retirar su unión al receptor natural, o para enmascarar un epítipo inmunogénico.

Métodos de fabricación graduable de VAA

En la técnica también se conocen métodos de fabricación graduable (por ejemplo, para la producción a escala comercial) de VAA que pueden adaptarse para generar composiciones de VAAr que son adecuadamente homogéneas y carecen de contaminantes para su uso en aplicaciones clínicas, y se resumen brevemente a continuación.

Los virus adenoasociados pueden fabricarse a escala usando una estrategia basada en líneas celulares de mamífero, tales como la estrategia que usa líneas celulares productoras estables descrita en Thome et al., 2009, "Manufacturing recombinant adeno-associated viral vectors from producer cell clones", Human Gene Therapy 20: 707-714, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En la estrategia descrita por Thorpe y colegas, se modifican genéticamente líneas celulares productoras contienen establemente todos los componentes necesarios para generar un VAAr - la construcción transgénica (transgén flanqueado por ITR) y genes rep y cap de VAA - que se inducen para fabricar virus por infección con un virus auxiliar, tal como un adenovirus vivo de tipo 5 (Ad5) (cuyos métodos de producción graduable también son conocidos en la técnica). Las líneas celulares productoras se transfectan establemente con una o más construcciones que contienen (i) un casete de empaquetamiento (genes rep y cap del serotipo deseado y elementos reguladores necesarios para su expresión), (ii) el transgén flanqueado por las ITR, (iii) un marcador de selección de células de mamífero y (iv) componentes necesarios para la propagación de plásmidos en bacterias. Las líneas celulares productoras estables se obtienen transfectando una o más construcciones de empaquetamiento, seleccionando células resistentes a fármacos, y sembrando copias en placas para garantizar la producción del VAA recombinante en presencia del virus auxiliar,

explorándose posteriormente el comportamiento y calidad. Una vez seleccionados los clones apropiados, el crecimiento de las líneas celulares se incrementa, las células se infectan con el auxiliar de adenovirus y los VAAr resultantes se recogen de las células.

En una alternativa a los métodos descritos en Thorpe *et al.*, una línea celular de empaquetamiento se transfecta de manera estable con los genes rep y cap de VAA y la construcción transgénica se introduce por separado cuando se desea la producción del VAAr. Aunque Thorpe y colegas usan células HeLa como línea celular productora, puede usarse cualquier línea celular (por ejemplo, Vero, A549, HEK 293) que sea susceptible a la infección con virus auxiliar, capaz de mantener copias integradas estables del gen rep y, preferentemente, capaz de crecer bien en suspensión para la expansión y producción en un biorreactor de acuerdo con los métodos descritos en Thorpe *et al.*

En los métodos anteriores, los VAAr se producen usando adenovirus como un virus auxiliar. En una modificación de estos métodos, pueden generarse VAAr usando células productoras establemente transfectadas con una o más construcciones que contienen funciones auxiliares de adenovirus, evitando la necesidad de infectar las células con adenovirus. En una variación, una o más de las funciones auxiliares del adenovirus están incluidas dentro de la misma construcción que los genes rep y cap. En estos métodos, la expresión de las funciones auxiliares del adenovirus puede colocarse bajo el control transcripcional o postranscripcional para impedir la citotoxicidad asociada a los adenovirus.

En una alternativa para producir líneas de células estables, también pueden producirse VAA a escala usando métodos de transfección transitoria, tales como los descritos por Wright, 2009, "Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production", Human Gene Therapy 20: 698-706, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La estrategia de Wright implica la transfección de células con construcciones que contienen (i) el transgén de interés flanqueado por las ITR; (ii) los genes rep y cap de VAA; y (iii) genes de virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus) necesarios para dar soporte a la replicación del genoma y empaquetamiento (o como alternativa, un virus auxiliar, como se describe en Thorpe *et al.*). Como alternativa, las funciones auxiliares del adenovirus pueden estar incluidas dentro de la misma construcción que los genes rep y cap. Por lo tanto, los VAAr se producen sin tener que garantizar la transfección estable del transgén y las construcciones rep/cap. Esto proporciona un método flexible y rápido para generar los VAA y, por tanto, ideal para el desarrollo preclínico y clínico de fase temprana. Los VAA recombinantes pueden generarse transfectando de manera transitoria líneas de células de mamífero con las construcciones usando métodos de transfección transitoria conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos de transfección más adecuados para la producción a gran escala incluyen la coprecipitación del ADN con fosfato de calcio, el uso de policationes tales como polietilenimina (PE) y lípidos catiónicos.

La efectividad del adenovirus como un auxiliar también se ha aprovechado para desarrollar métodos alternativos para la producción de VAA recombinante a gran escala, por ejemplo usando virus híbridos basados en adenovirus y en VAA (un "híbrido Ad-VAA"). Este método de producción tiene la ventaja de que no requiere transfección - todo lo que se requiere para la producción de VAAr es la infección de las células de empaquetamiento rep/cap por adenovirus. En este proceso, una línea celular estable rep/cap se infecta con un adenovirus auxiliar que posee genes E 1 funcionales y, posteriormente, un virus híbrido recombinante Ad-VAA en el que el transgén VAA más la secuencia de ITR se inserta en la región EI del adenovirus. En Zhang *et al.*, 2009, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad, se describen métodos para generar híbridos Ad-VAA y su uso en la producción de VAA recombinante.

En otra variación, pueden generarse VAAr usando virus híbridos basados en VAA y virus del herpes simple de tipo 1 (HSV) (un híbrido "HSV / VAA"), tal como se describe en Clement *et al.*, 2009, "Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies", Human Gene Therapy 20: 796-806, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Este método explica con más detalle la posibilidad de usar el HSV como un virus auxiliar para la producción de VAA (muy conocido en la técnica y también revisado en Clement *et al.*). En resumen, los híbridos HSV/VAA comprenden una construcción transgénica de VAA dentro de una estructura de HSV. Estos híbridos pueden usarse para infectar células productoras que proporcionan las funciones auxiliares de herpes virus y rep/cap, o pueden usarse en infecciones conjuntas con el HSV recombinante que proporcionan las funciones auxiliares, dando como resultado la generación de VAAr que encapsidan el transgén de interés.

En otro método, pueden producirse composiciones de VAAr a escala usando expresión mediada por baculovirus recombinante de componentes de VAA en células de insecto, por ejemplo, como se describe en Virag *et al.*, 2009, "Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: Overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy", Human Gene Therapy 20: 807-817, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En este sistema, el sistema del vector de expresión de baculovirus (BEV) bien conocido se adapta para producir los VAA recombinantes. Por ejemplo, el sistema descrito por Virag *et al.* comprende la infección de células de insecto Sf9 con dos (o tres) BEV diferentes que proporcionan (i) rep y cap de VAA (en uno o dos BEV) y (ii) la construcción transgénica. Como alternativa, las células Sf9 pueden modificarse por ingeniería genética de manera estable para expresar rep y cap, lo cual permite la producción de VAA recombinante después de la infección con solo un BEV sencillo que contiene la construcción transgénica. Para garantizar la

producción estequiométrica de las proteínas Rep y Cap, siendo esta última necesaria para un empaquetamiento eficiente, los vectores de expresión de baculovirus (BEV) pueden diseñarse por ingeniería genética para que incluyan características que permitan la regulación pre- y postranscripcional de la expresión génica. Después, las células Sf9 empaquetan la construcción transgénica en cápsides de VAA, y el VAAr resultante puede recogerse del sobrenadante de cultivo o a través de lisado celular.

Cada uno de los métodos anteriores permite la efectuar la producción a escala de las composiciones de VAAr. El proceso para la fabricación de una composición de VAAr adecuada para su uso comercial (incluyendo el uso clínico) también puede comprender etapas para retirar las células contaminantes; la retirada e inactivación de virus auxiliares (y cualquier otro virus contaminante, tal como partículas endógenas similares a retrovirus); la retirada e inactivación de cualquier VAArc; la minimización de la producción de, la cuantificación y retirada de partículas de VAA vacías (menos transgenes) (por ejemplo, por centrifugación); la purificación del VAAr (por ejemplo, por filtración o cromatografía basada en tamaño y/o afinidad) y el ensayo de la composición de VAAr con respecto a la pureza y seguridad. Estos métodos también se proporcionan en las referencias citadas en los párrafos anteriores y se incorporan en el presente documento para esta finalidad.

Una desventaja de los métodos anteriores de la reproducción a escala de VAAr es que muchos de los VAAr se obtienen a través de lisis de las células productoras; lo cual requiere un esfuerzo significativo no solo para obtener el virus sino también para aislarlo de los contaminantes celulares. Para minimizar estos requisitos, se pueden utilizar métodos de producción de VAAr a escala que no conllevan la lisis celular, tal como se proporciona en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2007/127264, cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. En el ejemplo de la Sección 6 proporcionada más adelante, se proporciona un nuevo método a escala que obtiene VAAr a partir de los sobrenadantes del cultivo celular, que también puede adaptarse para la preparación de la composición de VAAr para su uso de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona células humanas o no humanas que contienen una o más de las construcciones de ADN y/o composiciones de virus de la invención. Dichas células pueden modificarse genéticamente y pueden incluir, por ejemplo, células de plantas, bacterias, de mamíferos no humanos o de mamíferos. La selección de los tipos de células no es una limitación de la divulgación.

5.2. Composiciones

La presente invención proporciona composiciones de virus con replicación defectuosa adecuadas para su uso en terapia (*in vivo* o *ex vivo*) en las que el genoma del virus (o los genomas colectivos de dos o más reservas de virus con replicación defectuosa usadas en combinación) comprende la unidad transgénica terapéutica y la unidad de ablación definida en la Sección 3.1, y descrita anteriormente; y adicionalmente puede comprender una proteína de fusión dimerizable o una o más unidades de dominio TF (a las que se hace referencia por comodidad como unidad(es) dimerizable(s)). En las composiciones de la divulgación puede usarse cualquier virus adecuado para terapia génica incluyendo, pero sin limitación, virus adenoasociados ("VAA"), adenovirus, virus del herpes simple, lentivirus o un retrovirus. En la invención, las composiciones son VAA con replicación defectuosa, que se describen con más detalle en la Sección 5.2.1 del presente documento.

Las composiciones de la invención comprenden el o los virus con replicación defectuosa adecuados para terapia (*in vivo* o *ex vivo*), comprendiendo el genoma del o de los virus una unidad transgénica, una unidad de ablación y/o una unidad dimerizable. En una realización, una composición de la invención comprende un virus adecuado para terapia génica en el que el genoma del virus comprende una unidad transgénica. En otra realización, una composición de la invención comprende un virus adecuado para la terapia génica en el que el genoma del virus comprende una unidad de ablación. En otra realización, una composición de la invención comprende un virus adecuado para terapia génica en el que el genoma del virus comprende una unidad dimerizable. En otra realización, una composición de la invención comprende un virus adecuado para terapia génica en el que el genoma del virus comprende una unidad transgénica y una unidad de ablación. En otra realización, una composición de la invención comprende un virus adecuado para terapia génica en el que el genoma del virus comprende una unidad transgénica y una unidad dimerizable. En otra realización, una composición de la invención comprende un virus adecuado para terapia génica en el que el genoma del virus comprende una unidad de ablación y una unidad dimerizable. En otra realización, una composición de la invención comprende virus adecuados para terapia génica en los que el genoma del virus comprende una unidad transgénica, una unidad de ablación y una unidad dimerizable.

La invención también proporciona composiciones que comprenden construcciones de ADN recombinante que comprenden una o más unidades transcripcionales descritas en el presente documento. Las composiciones que comprenden construcciones de ADN recombinante se describen con más detalle en la Sección 5.2.2.

5.2.1. Composiciones de virus con replicación defectuosa para terapia génica

La invención proporciona composiciones que comprenden una o más reservas de virus con replicación defectuosa y formulaciones del uno o más virus con replicación defectuosa en un vehículo fisiológicamente aceptable. Estas

formulaciones pueden usarse para la transferencia génica y/o terapia génica. El genoma viral de las composiciones comprende: (a) una primera unidad de transcripción que codifica un producto terapéutico en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha unidad al menos un sitio de reconocimiento de ablación (unidad transgénica); y (b) una segunda unidad de transcripción que codifica un ablacionador específico para el sitio de reconocimiento de ablación, o un fragmento del mismo, en asociación operativa con un promotor. El ablacionador es como se define en otras partes de esta memoria descriptiva.

Reservas de VAA

En la invención, el virus con replicación defectuosa de una composición de la invención es un VAA, preferentemente VAA1, VAA6, VAA6.2, VAA7, VAA8, VAA9 o rh10. En una realización, el VAA de la composición es VAA8. Debido a las limitaciones de empaquetamiento del VAA (aproximadamente 4,5 kb) en la mayoría de los casos, para facilitar la fabricación, la unidad transgénica, la unidad de ablación y la unidad dimerizable se dividieron entre dos o más vectores de virus y se empaquetaron en una reserva de VAA distinta. En una realización, la composición de virus con replicación defectuosa comprende la primera unidad de transcripción (una unidad transgénica) empaquetada en una reserva de VAA, y la segunda (una unidad de ablación), tercera y cuarta unidades de transcripción (unidad de dominio TF dimerizable) empaquetadas en una segunda reserva de VAA. En otra realización, la composición de virus defectuoso en replicación comprende la segunda unidad de transcripción (una unidad de ablación) empaquetada en una reserva de VAA, y la primera (una unidad transgénica), tercera y cuarta unidades de transcripción (unidad de dominio TF dimerizable) empaquetadas en una segunda reserva de VAA. En otra realización, las cuatro unidades pueden empaquetarse en una reserva de VAA, pero esto impone límites sobre el tamaño de los ADN que pueden empaquetarse. Por ejemplo, cuando se usa Cre como ablacionador y FRB/FKB como dominios TF dimerizables (como se muestra en los ejemplos, más adelante), para empaquetar las cuatro unidades en una reserva de VAA, el tamaño del ADN que codifica el transgén terapéutico debe ser menor de aproximadamente 900 pares de bases de longitud; esto daría cabida a los ADN que codifican citocinas, agentes terapéuticos de ARNi y similares.

Debido a las limitaciones de tamaño del genoma del VAA para el empaquetamiento, las unidades de transcripción pueden modificarse por ingeniería genética y empaquetarse en dos o más reservas de VAA. Cuando se empaquetan en una reserva de virus que se usa como una composición de virus de acuerdo con la invención, o en dos o más reservas virales que forman una composición de virus de la invención, el genoma de virus usado para el tratamiento debe contener colectivamente la primera y segunda unidades de transcripción que codifican el transgén terapéutico y el ablacionador; y adicionalmente pueden comprender unidades de transcripción adicionales (por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción que codifican los dominios TF dimerizables). Por ejemplo, la primera unidad de transcripción puede empaquetarse en una reserva de virus, y la segunda, tercera y cuarta unidades de transcripción pueden empaquetarse en una segunda reserva de virus. Como alternativa, la segunda unidad de transcripción puede empaquetarse en una reserva de virus, y la primera, tercera y cuarta unidades de transcripción pueden empaquetarse en una segunda reserva de virus. Aunque es útil para el VAA debido a las limitaciones de tamaño en el empaquetamiento del genoma del VAA, pueden usarse otros virus para preparar una composición de virus de acuerdo con la invención. En otra realización, las composiciones de virus de la invención, cuando contienen múltiples virus, pueden contener diferentes virus con déficit de replicación (por ejemplo, VAA y adenovirus).

En una realización, una composición de virus de acuerdo con la invención contiene dos o más reservas de VAA diferentes (u otra reserva viral), en las combinaciones descritas anteriormente. Por ejemplo, una composición de virus puede contener una primera reserva de virus que comprende el gen terapéutico con sitios de reconocimiento de ablación y un primer ablacionador y una segunda reserva de virus que contiene uno o más ablacionadores adicionales. Otra composición de virus puede contener una primera reserva de virus que comprende un gen terapéutico y un fragmento de ablacionador y una segunda reserva de virus que comprende otro fragmento de un ablacionador. A partir de la descripción de los componentes del presente sistema serán evidentes otras diversas combinaciones de dos o más reservas de virus en una composición de virus de la invención.

Formulaciones de virus

Las composiciones de la invención pueden formularse para la administración a animales, para fines veterinarios (por ejemplo, ganado, vacas, cerdos, etc.), y a otros mamíferos no humanos, así como a seres humanos. Los virus con replicación defectuosa pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en la transferencia génica y en aplicaciones de terapia génica. Debido a que los virus tienen replicación defectuosa, la dosificación de la formulación no puede medirse o calcularse como una UFP (unidad formadora de placas). En su lugar, puede usarse la cuantificación de las copias del genoma ("CG") como una medición de la dosis contenida en la formulación.

Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para determinar el número de copias del genoma (CG) de las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención. Un método para realizar las dosificaciones del número de CG del VAA es el siguiente: en primer lugar se tratan muestras del vector de VAA purificadas con DNasa para eliminar el ADN del genoma de VAA no encapsidado o el ADN del plásmido contaminante del proceso de producción. Las partículas resistentes a DNasa se someten después a tratamiento térmico para liberar el genoma

de la cápside. Los genomas liberados se cuantifican después mediante PCR en tiempo real usando conjuntos de cebador/sonda que se dirigen a la región específica del genoma viral (normalmente una señal poli A).

Además, las composiciones de virus con replicación defectuosa pueden formularse en unidades de dosificación que contienen una cantidad de virus con replicación defectuosa que está en el intervalo de aproximadamente $1,0 \times 10^9$ CG a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ CG (para tratar un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal) y preferentemente de $1,0 \times 10^{12}$ CG a $1,0 \times 10^{14}$ CG para un paciente humano. Preferentemente, la dosis de virus con replicación defectuosa en la formulación es de $1,0 \times 10^9$ CG, $5,0 \times 10^9$ CG, $1,0 \times 10^{10}$ CG, $5,0 \times 10^{10}$ CG, $1,0 \times 10^{11}$ CG, $5,0 \times 10^{11}$ CG, $1,0 \times 10^{12}$ CG, $5,0 \times 10^{12}$ CG o $1,0 \times 10^{13}$ CG, $5,0 \times 10^{13}$ CG, $1,0 \times 10^{14}$ CG, $5,0 \times 10^{14}$ CG o $1,0 \times 10^{15}$ CG.

Los virus con replicación defectuosa pueden formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Los virus con replicación defectuosa pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones de virus con replicación defectuosa pueden tener formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes. Las preparaciones líquidas de las formulaciones de virus con replicación defectuosa pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón. Como alternativa, las composiciones pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso.

También se incluye el uso de adyuvantes en combinación con o en mezcla con los virus con replicación defectuosa de la invención. Los adyuvantes contemplados incluyen, pero sin limitación, adyuvantes de sales minerales o adyuvantes de geles de sales minerales, adyuvantes en forma de partículas, adyuvantes de micropartículas, adyuvantes de mucosa y adyuvantes inmunoestimuladores. Los adyuvantes pueden administrarse a un sujeto como una mezcla con virus con replicación defectuosa de la invención, o usarse en combinación con los virus con replicación defectuosa de la invención.

5.2.2. Composiciones de construcciones de ADN recombinante para la producción de vectores de virus con replicación defectuosa útiles para fines terapéuticos

La invención proporciona composiciones de construcciones de ADN recombinante que comprenden una unidad transgénica, una unidad de ablación y/o una o dos unidades de dominio dimerizables flanqueadas por señales virales que definen la región a amplificar y empaquetar en partículas virales con replicación defectuosa. Estas construcciones de ADN pueden usarse para generar las composiciones de virus con replicación defectuosa y reservas.

En una realización, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad transgénica flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral. En otra realización, una composición de la invención comprende una construcción de ADN recombinante que comprende una unidad de ablación flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral. En otra realización, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad dimerizable flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral. En otra realización, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad transgénica y una unidad de ablación flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral. En otra realización, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad transgénica y una unidad dimerizable flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral. En otra realización, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad de ablación y una unidad dimerizable flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral. En otra realización, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad transgénica, una unidad de ablación y una unidad dimerizable flanqueada por señales de empaquetamiento de un genoma viral.

La primera unidad de transcripción codifica un producto terapéutico en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha unidad al menos un sitio de reconocimiento de ablación (unidad transgénica); y (b) la segunda unidad de transcripción que codifica un ablacionador específico para el sitio de reconocimiento de ablación, o un fragmento del mismo fusionado a un dominio de unión, en asociación operativa con un promotor que induce la transcripción en respuesta a un agente farmacológico (unidad de ablación). En otra realización, la construcción de ADN recombinante comprende un dominio TF dimerizable flanqueado por señales de empaquetamiento de un genoma viral.

En una realización preferida, la composición de la construcción de ADN recombinante comprende adicionalmente una unidad dimerizable anidada dentro de las señales de empaquetamiento viral. En una realización, cada unidad codifica un dominio dimerizable de un factor de transcripción que regula el promotor inducible de la segunda unidad

de transcripción, en la que (c) una tercera unidad de transcripción codifica el dominio de unión al ADN del factor de transcripción fusionado a un dominio de unión del agente farmacológico en asociación operativa con un promotor constitutivo; y (d) una cuarta unidad de transcripción codifica el dominio de activación del factor de transcripción fusionado a un dominio de unión del agente farmacológico en asociación operativa con un promotor constitutivo. En otra realización, al menos una de (c) o (d) se expresa bajo un promotor inducible. En una realización específica, el agente farmacológico que induce la transcripción del promotor que está en asociación operativa con la segunda unidad de la composición de la construcción de ADN recombinante es un dimerizador que dimeriza los dominios del factor de transcripción medidos *in vitro*. En otra realización específica más, el agente farmacológico que induce la transcripción del promotor que está en asociación operativa con la segunda unidad de la composición de la construcción de ADN recombinante es rapamicina. En una realización adicional, la construcción de ADN recombinante comprende una unidad de proteína de fusión dimerizable. Por ejemplo, la unidad de proteína de fusión dimerizable puede codificar (a) un dominio de unión de una enzima fusionada a un dominio de unión y (b) un dominio catalítico de la enzima fusionada a un dominio de unión, donde los dominios de unión son dominios de unión de ADN o dominios de unión para un dimerizador.

Para conservar espacio dentro del genoma o genomas virales, pueden modificarse por ingeniería genética unidades de transcripción bicistrónicas. Por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción pueden modificarse por ingeniería genética como una unidad bicistrónica que contiene un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) que permite la expresión conjunta de productos génicos heterólogos mediante un mensaje desde un solo promotor. Como alternativa, un solo promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contenga, en una sola fase de lectura abierta (ORF), dos o tres o genes heterólogos (por ejemplo, la tercera y cuarta unidades de transcripción) separados entre sí por secuencias que codifican un péptido autoescindible (por ejemplo, T2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (por ejemplo, furina). Por tanto, la ORF codifica una sola poliproteína que, bien durante (en el caso de T2A) o después de la traducción, se escinde en las proteínas individuales. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que aunque estos IRES y sistemas de poliproteína pueden usarse para ahorrar espacio de empaquetamiento de VAA, solo pueden usarse para la expresión de componentes que pueden dirigirse por el mismo promotor.

En una realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad dimerizable comprende un IRES. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una tercera y cuarta unidad de transcripción (una unidad de dominio TF dimerizable) comprende un IRES. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad transgénica comprende un IRES. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad de ablación comprende un IRES. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad dimerizable comprende un IRES.

En una realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una tercera y una cuarta unidad de transcripción (una unidad de dominio TF dimerizable) comprende la secuencia T2A. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad transgénica comprende la secuencia T2A. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad de ablación comprende la secuencia T2A. En otra realización específica, una composición de construcción de ADN recombinante que comprende una unidad de dominio TF dimerizable comprende la secuencia T2A.

En la divulgación realizada, el ablacionador que está codificado por la segunda unidad de transcripción de la composición de la construcción de ADN recombinante es una endonucleasa, una recombinasa, una meganucleasa, o una endonucleasa de dedo de cinc artificial que se une al sitio de reconocimiento de ablación en la primera unidad de transcripción y escinde o realiza la ablación del ADN. En una realización específica, el ablacionador es ere y el sitio de reconocimiento de ablación es LoxP, o el ablacionador es FLP y el sitio de reconocimiento de ablación es FRT. El ablacionador que está codificado por la segunda unidad de transcripción de la composición de la construcción de ADN recombinante puede ser un ARN de interferencia, una ribozima, o un antisentido que realiza la ablación del transcrito de ARN de la primera unidad de transcripción o suprime la traducción del transcrito de ARN de la primera unidad de transcripción. En una realización específica, la transcripción del ablacionador está controlada por un sistema tet-on/off, un sistema tetR-KRAB, un sistema regulable por mifepristona (RU486), un sistema regulable por tamoxifen-dep, o un sistema regulable por ecdisona-dep.

La composición de la construcción de ADN recombinante contiene señales de empaquetamiento que flanquean las unidades de transcripción que se desea amplificar y empaquetar en los vectores de virus con replicación defectuosa. En la invención, las señales de empaquetamiento son ITR de VAA. Cuando va a producirse un VAA seudotipificado, las ITR se seleccionan de una fuente que difiere de la fuente de VAA de la cápside. Por ejemplo, las ITR de VAA2 pueden seleccionarse para su uso con una cápside de VAA1, VAA8 o VAA9, y así sucesivamente. En otra realización específica, las ITR de VAA pueden ser de la misma fuente que la de la cápside, por ejemplo, las ITR de VAA1, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, rh10, etc. En otra realización específica, una composición de la construcción de ADN recombinante comprende una primera unidad de transcripción (unidad transgénica) flanqueada por las ITR de VAA, y la segunda (unidad de ablación), y la tercera y cuarta unidades de transcripción opcionales (una unidad de dominio TF dimerizable) y/o una o más unidades de proteína de fusión dimerizable, flanqueadas por las ITR de VAA.

En otra realización específica más, una composición de la construcción de ADN recombinante comprende una segunda unidad de transcripción (unidad de ablación) flanqueada por las ITR de VAA y la primera (unidad transgénica), la tercera y la cuarta unidades de transcripción (una unidad de dominio TF dimerizable) están flanqueadas por las ITR de VAA. En una realización preferida, las unidades de transcripción de un sistema PIT están contenidas en dos o más composiciones de ADN recombinante.

En una realización específica, la construcción de ADN recombinante contiene una unidad transgénica que codifica uno cualquiera o más de los siguientes productos terapéuticos: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que neutraliza la infectividad por VIH, un receptor I del factor de crecimiento endotelial vascular soluble (sFlt-I), Factor VIII, Factor IX, factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), hemooxigenasa-1 (HO-1), o factor de crecimiento nervioso (NGF). En una realización específica, la construcción de ADN recombinante contiene una unidad transgénica que comprende uno cualquiera de los siguientes promotores que controlan la transcripción del gen terapéutico: un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor específico de célula, un promotor inducible o un promotor sensible a signos fisiológicos.

Las construcciones de ADN pueden usarse en cualquiera de los métodos descritos en la Sección 5.1.5 para generar reservas de virus de replicación defectuosa.

5.2.3. Composiciones farmacéuticas y formulaciones de dimerizadores

La presente invención proporciona, entre otras cosas, composiciones farmacéuticas que comprenden los dimerizadores de la invención, descritos en la Sección 5.1.4. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, estas composiciones farmacéuticas están adaptadas para fines veterinarios, por ejemplo, para la administración a un mamífero no humano (por ejemplo, ganado), tal como se describe en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a un sujeto a dosis terapéuticamente eficaces para realizar la ablación o escindir el transgén de una unidad transgénica de la invención o para realizar la ablación del transcrito del transgén o inhibir su traducción. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de la composición farmacéutica suficiente para producir la mejora de los síntomas causados por la expresión del transgén, por ejemplo, toxicidad, o para producir una inhibición de al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de expresión del transgén.

En una realización, se administra una cantidad de composición farmacéutica que comprende un dimerizador de la invención que está en el intervalo de aproximadamente 0,1- 5 microgramos (µg)/kilogramo (kg). Para esta finalidad, una composición farmacéutica que comprende un dimerizador de la invención se formula en dosis en el intervalo de aproximadamente 7 mg a aproximadamente 350 mg para tratar a un sujeto medio con un peso corporal de 70 kg. La cantidad de composición farmacéutica que comprende un dimerizador de la invención administrada es: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 o 5,0 mg/kg. La dosis de un dimerizador en una formulación es de 7, 8, 9, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, o 750 mg (para tratar a un sujeto medio con un peso corporal de 70 kg). Estas dosis se administran preferentemente por vía oral. Estas dosis pueden proporcionarse una vez o de manera repetida, tal como todos los días, un día sí y otro no, semanalmente, cada quince días o mensualmente. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se proporcionan una vez a la semana durante un periodo de aproximadamente 4-6 semanas. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un dimerizador se administra a un sujeto en una dosis, o en dos dosis, o en tres dosis, o en cuatro dosis, o en cinco dosis, o en seis dosis o más. El intervalo entre las dosificaciones puede determinarse basándose en la determinación del médico de que existe la necesidad de inhibir la expresión del transgén, por ejemplo, para mejorar los síntomas causados por la expresión del transgén, por ejemplo, la toxicidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando la necesidad de realizar la ablación del transgén es aguda, pueden administrarse dosis diarias de una composición farmacéutica que comprende un dimerizador. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando la necesidad de que se realice la ablación del transgén es menos aguda, o no es aguda, pueden administrarse dosificaciones semanales de una composición farmacéutica que comprende un dimerizador.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Por tanto, los dimerizadores y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para la administración por inhalación o insuflación (a través de la boca o de la nariz), oral, bucal, parenteral, rectal o transdérmica. También se contemplan métodos de administración no invasivos.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adquirir la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse con métodos bien

conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tener forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto en seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoato o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener, según sea apropiado, sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes.

Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera adecuada para proporcionar una liberación controlada de los dimerizadores.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adquirir la forma de comprimidos o pastillas para chupar, formuladas de una manera convencional.

Para la administración por inhalación, los dimerizadores para su uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o desde un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar la cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para su uso como un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo de los dimerizadores y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los dimerizadores pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases de dosis múltiple, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adquirir formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleaginosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso.

Los dimerizadores también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los dimerizadores también pueden formularse como una preparación en depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implante (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los dimerizadores pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o en un dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones para su administración.

También se incluye el uso de adyuvantes en combinación con o mezclados con los dimerizadores de la invención. Los adyuvantes contemplados incluyen, pero sin limitación, adyuvantes de sales minerales, o adyuvantes de geles de sales minerales, adyuvantes en forma de partículas, adyuvantes en forma de micropartículas, adyuvantes de mucosa y adyuvantes inmunoestimuladores. Los adyuvantes pueden administrarse a un sujeto como una mezcla con dimerizadores de la invención o pueden usarse en combinación con los dimerizadores de la invención.

5.3. Tratamiento de enfermedades y trastornos

La divulgación proporciona métodos para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que pueda tratarse mediante terapia génica. En un aspecto, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejoría de una enfermedad o trastorno, o de al menos un síntoma perceptible del mismo. En otro aspecto, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejoría de al menos un parámetro físico medible asociado con una enfermedad o un trastorno, no necesariamente perceptible por el sujeto. En otro aspecto adicional, "tratamiento" o "tratar" se refiere a la inhibición del avance de una enfermedad o trastorno, bien físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma perceptible, fisiológicamente, por ejemplo estabilización de un parámetro físico o ambas cosas. Otras afecciones, incluyendo cáncer, trastornos inmunitarios y enfermedades y afecciones veterinarias, también pueden tratarse.

5.3.1. Enfermedades diana

Los tipos de enfermedades y trastornos que pueden tratarse con la presente invención incluyen, pero sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad; retinopatía diabética; enfermedades infecciosas, por ejemplo, gripe pandémica del VIH, agentes de guerra biológica de categoría 1 y 2, o cualquier nueva infección viral emergente; enfermedades autoinmunitarias; cáncer; mieloma múltiple; diabetes; lupus eritematoso sistémico (LES); hepatitis C; esclerosis múltiple; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); enfermedad de Huntington; epilepsia; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); inflamación articular; artritis; infarto de miocardio (IM); insuficiencia cardíaca congestiva (ICC); hemofilia A o hemofilia B.

Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse por la presente invención están causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y parásitos. La limitación no se realiza tratando o previniendo enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares. Muchos microorganismos importantes desde el punto de vista médico se han descrito ampliamente en la bibliografía, por ejemplo, véase C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Las infecciones bacterianas o enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante la presente invención están causadas por bacterias que incluyen, pero sin limitación, bacterias que tienen una fase intracelular en su ciclo de vida, tales como micobacterias (por ejemplo, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, o *M. africanum*), rickettsia, micoplasma, clamidia y legionela. Otros ejemplos de infecciones bacterianas contempladas incluyen, pero sin limitación, infecciones causadas por bacilos gram positivos (por ejemplo, los géneros *Listeria*, *Bacillus* tales como *Bacillus anthracis*, especies de *Erysipelothrix*), bacilos gram negativos (por ejemplo, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio*, y especies de *Yersinia*), bacterias espiroquetas (por ejemplo, especies de *Borrelia* incluyendo *Borrelia burgdorferi* que causa la enfermedad de Lyme), bacterias anaerobias (por ejemplo, especies de *Actinomyces* y *Clostridium*), cocos gram positivos y gram negativos, especies de *Enterococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Pneumococcus*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Neisseria*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. karasaii*, *M. gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Los virus infecciosos de vertebrados tanto humanos como no humanos incluyen retrovirus, virus de ARN y virus de ADN. Los ejemplos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, pero sin limitación: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LA V o HTLV-III/LA V, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picomaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio. *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae*, (por ejemplo, virus Hantaan, virus del bonga, flebovirus y Nairovirus; *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Bimaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papilloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), herpes virus; *Poxviridae* (variola virus, vaccinia virus y poxvirus); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiformes, el agente de la hepatitis delta (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agente de hepatitis no A no B (clase 1 = transmitidos internamente; clase 2 = transmitidos por vía parenteral (es decir hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse por la presente invención incluyen, pero sin limitación, amebiasis, malaria, leishmania, coccidia, giardiasis, criptosporidiosis, toxoplasmosis y tripanosomiasis. También se incluyen infecciones por diversos gusanos, tales como, pero sin limitación, ascariasis, ancilostomiasis, triquiuriasis, estrongiloidiasis, toxocariasis, triquinosis, oncocercuasis, filaria y dirofilariasis. También se incluyen infecciones por diversos trematodos, tales como, pero sin limitación, esquistosomiasis, paragonimiasis y clonorchiasis. Los parásitos que causan estas enfermedades pueden clasificarse basándose en si son intracelulares o extracelulares. Un "parásito intracelular" de la manera en la que se usa en el presente documento es un parásito cuyo ciclo de vida completo es intracelular. Los ejemplos de parásitos intracelulares de seres humanos incluyen

Leishmania spp., *Plasmodium spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia spp.*, y *Trichinella spiralis*. Un "parásito extracelular" de la manera que se usa en el presente documento es un parásito cuyo ciclo de vida completo es extracelular. Los parásitos extracelulares que pueden infectar seres humanos incluyen *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Naegleria* y *Acanthamoeba*, así como la mayoría de los helmintos. Otra clase más de parásitos se define por ser principalmente extracelular pero con una existencia intracelular obligada en una fase crítica en su ciclo de vida. Dichos parásitos reciben el nombre en el presente documento de "parásitos intracelulares obligados". Estos parásitos pueden existir, en la mayor parte de su vida o solamente en una pequeña parte de su vida, en un entorno extracelular, pero todos ellos tienen al menos una fase intracelular obligada en su ciclo de vida. Esta última categoría de parásitos incluye *Trypanosoma rhodesiense* y *Trypanosoma gambiense*, *Isospora spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Eimeria spp.*, *Neospora spp.*, *Sarcocystis spp.*, y *Schistosoma spp.*

Los tipos de cánceres que pueden tratarse o prevenirse con la presente invención incluyen, pero sin limitación, sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, condroma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer del cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma,ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de las cadenas pesadas.

5.3.2. Dosificación y modo de administración de los vectores virales

Las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención pueden administrarse a un sujeto humano mediante cualquier método o régimen conocido en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención pueden administrarse a un sujeto humano mediante cualquier método descrito en las siguientes patentes y solicitudes de patente que se refieren a métodos del uso de vectores VAA en diversas aplicaciones terapéuticas: patentes de Estados Unidos n.º 7.282.199; 7.198.951; publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2008-0075737; US 2008-0075740; publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2003/024502; WO 2004/108922; WO 20051033321.

En una realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran por vía sistémica a través del hígado por inyección de un afluente mesentérico de la vena porta. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran por vía sistémica a través del músculo mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en los músculos cuádriceps o bíceps. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran a la región prosencefálica basal del cerebro que contiene el núcleo basal de Meynert (NBM) por inyección estereotáctica bilateral. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran al SNC por inyección bilateral intraputamina y/o intranigral. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran en las articulaciones por inyección intraarticular. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran en el corazón por infusión intracoronaria. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran a la retina por inyección en el espacio subretinal.

En otra realización, se administra una cantidad de la composición de virus con replicación defectuosa a una dosis eficaz que está en el intervalo de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ copias de genoma (CG)/kilogramo (kg) a aproximadamente $1,0 \times 10^{14}$ CG/kg, y preferentemente de $1,0 \times 10^{11}$ CG/kg a $1,0 \times 10^{13}$ CG/kg a un paciente humano. Preferentemente, la cantidad de la composición de virus con replicación defectuosa a administrar es de $1,0 \times 10^8$ CG/kg, $5,0 \times 10^8$ CG/kg, $1,0 \times 10^9$ CG/kg, $5,0 \times 10^9$ CG/kg, $1,0 \times 10^{10}$ CG/kg, $5,0 \times 10^{10}$ CG/kg, $1,0 \times 10^{11}$ CG/kg, $5,0 \times 10^{11}$ CG/kg, o $1,0 \times 10^{12}$ CG/kg, $5,0 \times 10^{12}$ CG/kg, $1,0 \times 10^{13}$ CG/kg, $5,0 \times 10^{13}$ CG/kg, $1,0 \times 10^{14}$ CG/kg.

Estas dosis pueden proporcionarse una vez o de manera repetida, tal como una vez al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada quince días o una vez al mes, o hasta que se detecte la expresión adecuada del transgén en el paciente. En una realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa se proporcionan una vez a la semana durante un periodo de aproximadamente 4-6 semanas, y el modo o sitio de administración se modifica preferentemente con cada administración. Lo más probable es que se requiera la inyección repetida para una ablación completa de la expresión transgénica. Después de una separación de dos o más inyecciones, estas pueden realizarse en el mismo sitio. Además, pueden proporcionarse inyecciones divididas. Por tanto, por ejemplo, puede proporcionarse la mitad de la dosis en un sitio y la otra mitad de la dosis en otro sitio el mismo día.

Cuando se empaquetan en dos o más reservas víricas, las composiciones de virus con replicación defectuosa pueden administrarse de manera simultánea o secuencial. Cuando dos o más reservas de virus se administran secuencialmente, la última de las reservas de virus administrada puede administrarse uno, dos, tres o cuatro días después de la administración de la primera reserva de virus. Preferentemente, cuando se administran dos reservas víricas secuencialmente, la segunda reserva de virus administrada se administra uno o dos días después de la administración de la primera reserva de virus.

Para determinar el número de copias del genoma (CG) de las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención puede usarse cualquier método conocido en la técnica. Un método para realizar un ajuste del número de CG del VAA es el siguiente: primero se tratan muestras purificadas del vector VAA con DNasa para eliminar el ADN del genoma del VAA no encapsidado o ADN plasmídico contaminante del proceso de producción. Las partículas resistentes a DNasa se someten después a un tratamiento térmico para liberar el genoma de la cápside. Los genomas liberados se cuantifican después mediante PCR en tiempo real usando conjuntos de cebador/sonda que se dirigen a la región específica del genoma viral (normalmente señal poli A).

En una realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran por vía sistémica a través del hígado mediante inyección de un afluyente mesentérico de la vena porta a una dosis de aproximadamente $3,0 \times 10^{12}$ GC/kg. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran por vía sistémica a través del músculo mediante hasta 20 inyecciones intramusculares en cualquiera de los músculos cuádriceps o bíceps a una dosis de aproximadamente $5,0 \times 10^{12}$ GC/kg. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran a la región prosencefálica basal del cerebro que contiene el núcleo basal de Meynert (NBM) mediante inyección bilateral estereotáctica a una dosis de aproximadamente $5,0 \times 10^{11}$ GC/kg. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran al SNC por inyección bilateral intraputamina y/o intranigral a una dosis en el intervalo de aproximadamente $1,0 \times 10^{11}$ GC/kg a aproximadamente $5,0 \times 10^{11}$ GC/kg. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran a las articulaciones mediante inyección intraarticular a una dosis de aproximadamente $1,0 \times 10^{11}$ GC/ml de volumen articular para el tratamiento de artritis inflamatoria. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran al corazón por inyección mediante infusión intracoronaria a una dosis en el intervalo de aproximadamente $1,4 \times 10^{11}$ GC/kg a aproximadamente $3,0 \times 10^{12}$ GC/kg. En otra realización, las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención se administran a la retina mediante inyección en el espacio subretiniano a una dosis de aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ GC/kg.

La Tabla 2 muestra ejemplos de transgenes que pueden administrarse a través de un tejido/órgano particular mediante el sistema PITA de la invención para tratar una enfermedad particular.

Tabla 2: Tratamiento de enfermedades

Enfermedad	Ejemplos de transgenes	Tejido diana
Degeneración macular relacionada con la edad	s-Fit-1, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab (Avastín), ranibizumab (Lucentis), o un anticuerpo de dominio (dAB)	Retina
VIH	Un anticuerpo neutralizante contra el VIH	Músculo y/o hígado
Cáncer	Agentes antiangiogénicos (s-Fit-1, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab (Avastín), ranibizumab (Lucentis), o un anticuerpo de dominio (dAB); citocinas que potencian las respuestas inmunitarias tumorales, anti-EGFR, IFN	Músculo y/o hígado.
Enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis, lupus sistémico con activación de linfocitos T; eritematoso, psoriasis, citocinas que predisponen a esclerosis múltiple inmunitaria (MS).	Anticuerpos que interfieren con las respuestas, por ejemplo, β -IFN; anticuerpo contra la molécula de adhesión integrina $\alpha 4$	Músculo y/o hígado
Mieloma múltiple	Anticuerpo anti-CD20	Músculo y/o hígado
Diabetes	GLP-1, IL-6	Músculo y/o hígado
Hepatitis C	β -IFN, ARNhp que se dirige a IRES	Músculo y/o hígado

Enfermedad	Ejemplos de transgenes	Tejido diana
Enfermedad de Alzheimer	NGF	Sistema nervioso central (SNC)
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	IGF-1	SNC
Enfermedad de Huntington	NGF, BDNF AND CNTF, ARNhp que se dirige a Huntington mutante	SNC
Epilepsia	Galanina, neuropéptido Y (NPY), factor neurotrófico derivado de líneas de células gliales (GDNF)	SNC
EPOC	Quimiocinas de la familia IL 8, antagonista de TNF	Pulmón
Artritis inflamatoria	Antagonista de TNF, IL-1, anti-CD 20, IL-6, antagonista de IL-1 r	Articulaciones
Infarto de miocardio	Hemooxigenasa-1	Corazón
Insuficiencia cardíaca congestiva	Factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	Corazón
Enfermedad de Parkinson	GDNF, descarboxilasa L- aminoácida aromática (ADCC), NGF	SNC

En un aspecto de la divulgación, un método para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad en un sujeto humano comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de virus con replicación defectuosa, en la que el producto terapéutico es un antagonista de VEGF.

5

En otro aspecto de la divulgación, un método para el tratamiento de la hemofilia A en un sujeto humano comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de virus con replicación defectuosa de la invención, en la que el producto terapéutico es el Factor VIII o sus variantes, tal como la cadena ligera y cadena pesada del heterodímero y el dominio con B deletado. Patente de Estados Unidos n.º 6.200.560 y patente de Estados Unidos n.º 6.221.349).

10

El gen del Factor VIII codifica 2351 aminoácidos y la proteína tiene seis dominios, denominada desde el extremo amino al extremo carboxilo A1-A2-B-A3-C1-C2 [Wood et al, Nature, 312:330 (1984); Vehar et al., Nature 312:337 (1984); y Toole et al, Nature, 342:337 (1984)]. El Factor VIII humano se procesa dentro de la célula para producir un heterodímero que comprende principalmente una cadena pesada que contiene los dominios A1, A2 y B y una cadena ligera que contiene los dominios A3, C1 y C2. Tanto el polipéptido monocatenario como el heterodímero circulan en el plasma como precursores inactivos, hasta que se activan mediante la escisión con trombina entre los dominios A2 y B que libera el dominio B y da como resultado la cadena pesada que consta de los dominios A1 y A2. El dominio B se deleta en la forma procoagulante activada de la proteína. Además, en la forma nativa, dos cadenas polipeptídicas ("a" y "b"), que flanquean el dominio B están unidas a un catión de calcio divalente. En algunas realizaciones, el minigén comprende los 57 primeros pares de bases de la cadena pesada del Factor VIII que codifica la secuencia señal de 10 aminoácidos, así como la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (hGH). En realizaciones alternativas, el minigén comprende adicionalmente los dominios A1 y A2, así como 5 aminoácidos del extremo N del dominio B y/o 85 aminoácidos del extremo C del dominio B, así como los dominios A3, C1 y C2. En otras realizaciones adicionales, los ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada del Factor VIII y la cadena ligera se proporcionan en un solo minigén separados por 42 ácidos nucleicos que codifican 14 aminoácidos del dominio B [patente de Estados Unidos n.º 6.200.560]. Pueden encontrarse ejemplos de formas de origen natural recombinantes del Factor VII en la bibliografía de patente y científica incluyendo la patente de Estados Unidos n.º 5.563.045, patente de Estados Unidos n.º 5.451.521, patente de Estados Unidos n.º 5.422.260, patente de Estados Unidos n.º 5.004.803, patente de Estados Unidos n.º 4.757.006, patente de Estados Unidos n.º 5.661.008, patente de Estados Unidos n.º 5.789.203, patente de Estados Unidos n.º 5.681.746, patente de Estados Unidos n.º 5.595.886, patente de Estados Unidos n.º 5.045.455, patente de Estados Unidos n.º 5.668.108, patente de Estados Unidos n.º 5.633.150, patente de Estados Unidos n.º 5.693.499, patente de Estados Unidos n.º 5.587.310, patente de Estados Unidos n.º 5.171.844, patente de Estados Unidos n.º 5.149.637, patente de Estados Unidos n.º 5.112.950, patente de Estados Unidos n.º 4.886.876, publicación de patente internacional n.º WO 94/11503, WO 87/07144, WO 92/16557, WO 91/09122, WO 97/03195, WO 96/21035, y WO 91/07490, solicitud de patente europea n.º EP 0 672 138, EP 0 270 618, EP 0 182 448, EP 0 162 067, EP 0 786 474, EP 0 533 862, EP 0 506 757, EP 0 874 057, EP 0 795 021, EP 0 670 332, EP 0 500 734, EP 0 232 112, y EP 0 160 457; Sanberg et al., XXth Int. Congress of the World Fed. Of Hemophilia (1992), y Lind et al., Eur. J. Biochem., 232:19 (1995).

15

20

25

30

35

En otro aspecto de la divulgación, un método para el tratamiento de la hemofilia B en un sujeto humano comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de virus con replicación defectuosa, en la que el producto terapéutico es el Factor IX.

- 5 En otro aspecto de la divulgación, un método para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto humano comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de virus con replicación defectuosa, en la que el producto terapéutico es el factor de crecimiento insulínico o factor de crecimiento de hepatocitos.

- 10 En otro aspecto de la divulgación, un método para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central en un sujeto humano comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de virus con replicación defectuosa, en la que el producto terapéutico es el factor de crecimiento nervioso.

5.4. Monitorización de la expresión transgénica y efectos secundarios no deseados.

15 5.4.1. Monitorización de la expresión transgénica

Después de la administración de las composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención, la expresión transgénica puede monitorizarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. La expresión de los transgenes administrados puede detectarse fácilmente, por ejemplo, cuantificando la proteína y/o el ARN codificado por dicho transgén. Por lo tanto, pueden emplearse muchos métodos convencionales en la técnica incluyendo, pero sin limitación, inmunoensayos para detectar y/o visualizar la expresión de proteínas (por ejemplo, transferencia de western, inmunoprecipitación seguido de electroforesis con gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), inmunocitoquímica, tinción inmunohistoquímica en secciones etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión génica detectando y/o visualizando respectivamente el ARNm que codifica un gen (por ejemplo, ensayos de northern, transferencias puntuales, hibridación *in situ*, etc.). El genoma vírico y el ARN derivado del transgén también pueden detectarse mediante PCR cuantitativa (PCRc). Dichos ensayos son habituales y muy conocidos en la técnica. Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden realizar la lisis de una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIP A (Triton x-100 o NP-40 al 1 %, desoxicolato sódico al 1 %, SDS al 0,1 %, NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M a pH 7,2, Trasylol al 1 %) complementado con fosfatasa de proteína y/o inhibidores de proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato sódico), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, de 1 a 4 horas) a 40 °C, añadir la proteína A y/o las perlas de proteína G sefarosa al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 40 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en un tampón de muestra/SDS. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de western. Un experto en la materia podrá reconocer los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo con un antígeno y la disminución del efecto de fondo (por ejemplo, mediante el pre-aclarado del lisado celular con perlas de Sefarosa).

Generalmente, el análisis de transferencia de western comprende la preparación de las muestras de proteína, la electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE al 8 %-20 % dependiendo del peso molecular del antígeno), la transferencia de la muestra de proteína desde el gel de poliacrilamida a una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa, PVDF o nailon, el bloqueo de la membrana en una solución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA al 3 % o leche desnatada), el lavado de la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), la incubación de la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, el lavado de la membrana en tampón de lavado, la incubación de la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o una molécula radiactiva (por ejemplo, 32P o 125I) diluida en tampón de bloqueo, el lavado de la membrana en tampón de lavado y la detección de la presencia del antígeno. Un experto en la materia podría reconocer los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y reducir el efecto de fondo.

Generalmente, los ELISA comprenden preparar el antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado a un agente detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ensayos ELISA el anticuerpo de interés no tiene que estar conjugado a un agente detectable. En lugar de ello, puede añadirse al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado a un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, puede usarse el anticuerpo para recubrir el pocillo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado con un agente detectable después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia podría reconocer los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ensayos ELISA conocidas en la técnica.

También puede usarse una lectura fisiológica o fenotípica para evaluar la expresión de un transgén. Por ejemplo, puede evaluarse la capacidad de un producto transgénico para mejorar la gravedad de una enfermedad o un síntoma asociado con la misma. Además, puede realizarse una exploración de tomografía de emisión de positrones (PET) y un ensayo de anticuerpos de neutralización.

Además, la actividad de un producto transgénico puede evaluarse utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, la actividad de un producto transgénico puede determinarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, 1P_3 , etc.), detectando la fosforilación de una proteína, detectando la activación de un factor de transcripción, o detectando una respuesta celular, por ejemplo, diferenciación celular o proliferación celular o apoptosis mediante un ensayo basado en células. La alteración de los niveles de un segundo mensajero celular o la fosforilación de una proteína pueden determinarse mediante, por ejemplo, inmunoensayos muy conocidos por el experto en la materia y descritos en el presente documento. La activación o inhibición de un factor de transcripción puede detectarse mediante, por ejemplo, mediante ensayos de cambio de electromovilidad y puede detectarse una respuesta celular tal como una proliferación celular mediante, por ejemplo, recuentos de células con azul de tripano, incorporación de ^3H -timidina y citometría de flujo.

5.4.2. Monitorización de efectos secundarios indeseables/toxicidad

Después de la administración de una composición de virus con replicación defectuosa de la invención a un paciente, los efectos secundarios no deseados y/o la toxicidad pueden monitorizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia para determinar si se debe administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un dimerizador (descrito en la Sección 5.2.3) para realizar la ablación o escindir un transgén o realizar la ablación del transcrito del transgén, o inhibir su traducción.

La presente divulgación proporciona métodos para determinar cuándo administrar un agente farmacológico para realizar la ablación del producto terapéutico en un sujeto que recibió una composición de virus con replicación defectuosa que codifica un producto terapéutico y un ablacionador, que comprende: (a) detectar la expresión del producto terapéutico en una muestra tisular obtenida del paciente, y (b) detectar un efecto secundario asociado con la presencia del producto terapéutico en dicho sujeto, donde la detección de un efecto secundario asociado con la presencia del producto terapéutico en dicho sujeto indica la necesidad de administrar el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador.

La divulgación también proporciona métodos para la determinación de cuándo administrar un agente farmacológico para realizar la ablación del producto terapéutico en un sujeto que recibe una composición de virus con replicación defectuosa que codifica un producto terapéutico y un ablacionador, que comprende: detectar el nivel de un marcador bioquímico de toxicidad asociado con la presencia del producto terapéutico en una muestra tisular obtenida de dicho sujeto, donde el nivel de dicho marcador que refleja la toxicidad indica la necesidad de administrar el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador. En la técnica se conocen marcadores bioquímicos de toxicidad e incluyen mediciones en suero de patologías clínicas tales como, pero sin limitación, marcadores para la función renal anómala (por ejemplo, nivel elevado de nitrógeno de urea en sangre (BUN) y de creatinina para toxicidad renal); aumento de la tasa de sedimentación de eritrocitos como un marcador para la inflamación generalizada, recuento bajo de glóbulos blancos, plaquetas o eritrocitos así como un marcador para la toxicidad de médula ósea, etc. Pueden realizarse ensayos de la función hepática (Ift) para detectar anomalías asociadas con la toxicidad hepática. Los ejemplos de dichos Ifts incluyen ensayos de albúmina, alanina transaminasa, aspartato transaminasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina y gamma glutamil transpeptidasa.

La divulgación comprende además métodos para determinar la presencia de ADN que codifica el producto génico terapéutico, su transcrito de ARN o su proteína codificada en una muestra tisular del sujeto después del tratamiento con el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador, donde la presencia del ADN que codifica el producto génico terapéutico, su transcrito de ARN o su proteína codificada indica la necesidad de repetir el tratamiento con el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador.

Un efecto secundario no deseado que puede monitorizarse en un paciente que ha recibido una composición de virus con replicación defectuosa de la invención es una respuesta de anticuerpo contra un producto transgénico secretado. Dicha respuesta de anticuerpo contra un producto transgénico secretado se produce cuando un anticuerpo se une al producto transgénico secretado o a los propios antígenos que comparten epítomos con el producto transgénico. Cuando el producto transgénico es un anticuerpo, la respuesta se denomina respuesta "antiidiotípica". Cuando los antígenos solubles se combinan con anticuerpos en el compartimiento vascular, estos pueden formar complejos inmunitarios circulantes que se quedan atrapados inespecíficamente en los lechos vasculares de diversos órganos, causando lo que se denomina enfermedades por complejo inmunitario tales como enfermedad del suero, vasculitis, nefritis, lupus eritematoso sistémico con vasculitis o glomerulonefritis.

En otra reacción inmunitaria más generalizada no deseable al producto transgénico secretado, una respuesta de anticuerpo contra el producto transgénico da como resultado una respuesta inmunitaria que reacciona en cruzado con uno o más autoantígenos, causando casi cualquier tipo de autoinmunidad. La autoinmunidad es el fracaso de un sistema inmunitario para reconocer sus partes constituyentes como propias, lo que permite una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos, dando lugar a una respuesta autoinmunitaria. La autoinmunidad contra el producto transgénico de la invención puede dar lugar a cualquier enfermedad autoinmunitaria, incluyendo, pero sin limitación, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria idiopática, dermatomiositis, diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-

Barre (GBS), antigangliósido, enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, enfermedad tisular conectiva mixta, miastenia grave, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositosis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, arteritis temporal, (también conocida como "arteritis de células gigantes"), colitis ulcerosa (uno de los dos tipos de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática "IBD"), vasculitis y granulomatosis de Wegener.

La enfermedad del complejo inmunitario y la autoinmunidad pueden detectarse y/o monitorizarse en pacientes que se han tratado con composiciones de virus con replicación defectuosa de la invención mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un método que puede realizarse para medir la enfermedad de complejo inmunitario y/o la autoinmunidad es un ensayo de complejo inmunitario cuyo propósito es demostrar la presencia de complejos inmunitarios en circulación en la sangre para calcular la gravedad de la enfermedad del complejo inmunitario y/o la enfermedad autoinmunitaria y monitorizar la respuesta después de la administración del dimerizador. Un ensayo de complejo autoinmunitario puede realizarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. En particular, un ensayo de complejo inmunitario puede realizarse usando uno cualquiera o más de los métodos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 4.141.965, patente de Estados Unidos n.º 4.210.622, patente de Estados Unidos n.º 4.210.622, patente de Estados Unidos n.º 4.331.649, patente de Estados Unidos n.º 4.544.640, patente de Estados Unidos n.º 4.753.893, y patente de Estados Unidos n.º 5.888.834, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La detección de síntomas causados por o asociados con una cualquiera de las siguientes enfermedades autoinmunitarias usando métodos conocidos en la técnica es otra forma de detectar una enfermedad de complejo inmunitario o autoinmunidad causada por un producto transgénico secretado que se codificó por una composición de virus con replicación defectuosa administrada a un sujeto humano: espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria idiopática, dermatomiositis, diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre (GBS), antigangliósido, enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, enfermedad mixta de tejido conectivo, miastenia grave, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositosis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes"), colitis ulcerosa (uno de dos tipos de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática "IBD"), vasculitis y granulomatosis de Wegener.

Una enfermedad común que surge de la autoinmunidad y de una enfermedad de complejo inmunitario es la vasculitis, que es una inflamación de los vasos sanguíneos. La vasculitis causa cambios en las paredes de los vasos sanguíneos, incluyendo espesamiento, debilitamiento, estrechamiento y cicatrización. Los ensayos comunes y procedimientos que pueden usarse para diagnosticar la vasculitis incluyen, sin limitación, análisis de sangre, tales como velocidad de sedimentación de los eritrocitos, ensayo de la proteína C reactiva, recuento de células sanguíneas completo y un ensayo de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos; análisis de orina, que pueden mostrar cantidades aumentadas de proteína; ensayos de formación de imágenes tales como rayos X, ultrasonido, tomografía computarizada (CT) y formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) para determinar si las arterias más grandes, tales como la aorta y sus ramificaciones, están afectadas; rayos X de vasos sanguíneos (angiogramas); y la realización de una biopsia de parte de un vaso sanguíneo. Los signos y síntomas generales de la vasculitis que pueden observarse en pacientes tratados con los métodos de la invención incluyen, sin limitación, fiebre, cansancio, pérdida de peso, dolor muscular y articular, pérdida de apetito y problemas relacionados con el sistema nervioso, tales como entumecimiento o debilidad.

Cuando la administración de una composición de virus con replicación defectuosa de la invención da como resultado una expresión transgénica local, pueden detectarse y/o monitorizarse las toxicidades localizadas para determinar si se debe administrar al paciente una composición farmacéutica que comprenda un dimerizador (descrito en la Sección 5.2.3) para realizar la ablación o escindir un transgén o realizar la ablación del transcrito del transgén o inhibir su traducción. Por ejemplo, cuanto se administra a la retina una composición de virus con replicación defectuosa de la invención que comprende una unidad transgénica que decodifica un inhibidor de VEGF para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, se piensa que el VEGF puede ser neuroprotector en la retina y su inhibición podría empeorar la vista debido a la disminución de células ganglionales. Por tanto, después de la administración de dicha composición de virus con replicación defectuosa, la vista puede monitorizarse regularmente y la disminución de células ganglionales puede detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, formación de imágenes no invasiva de la retina. Además, la inhibición de VEGF también puede reducir el sistema microvascular necesario en la retina, que puede monitorizarse usando angiografía con fluoresceína o cualquier otro método conocidos en la técnica.

En general, los efectos secundarios que pueden detectarse/monitorizarse en un paciente después de la administración de un virus con replicación defectuosa de la invención para determinar si se debe administrar una composición farmacéutica que comprende un dimerizador (descrito en la Sección 5.2.3) al paciente, incluyen, pero sin limitación, sangrado del intestino o de cualquier órgano, sordera, pérdida de visión, disfunción renal, demencia, depresión, diabetes, diarrea, vómitos, disfunción eréctil, fiebre, glaucoma, alopecia, cefalea, hipertensión, palpitaciones cardíacas, insomnio, acidosis láctica, daño hepático, melasma, trombosis, priapismo, rabdomiolisis, convulsiones, somnolencia, aumento del apetito, disminución del apetito, mareos, ictus, disfunción cardíaca o ataque

cardíaco. Puede emplearse cualquier método comúnmente usado en la técnica para detectar los síntomas anteriores o cualquier otro efecto secundario.

Terapia ablacionadora; una vez que se ha determinado que un producto transgénico que se ha administrado al paciente ha causado efectos secundarios no deseables en el paciente, puede administrarse al paciente una composición farmacéutica que comprenda un dimerizador usando cualquiera de los regímenes, modos de administración o dosis que se describen en la Sección 5.2.3 del presente documento.

La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, pueden realizarse diversas modificaciones de la invención además de las descritas que serán obvias para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden incluirse dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

6. EJEMPLO 1: FABRICACIÓN DE VECTORES VAA RECOMBINANTES A ESCALA

Un proceso de producción de VAA recombinante, de alto rendimiento, se basó en transfección mediada por polietilenimina (PEI) de células de mamífero y centrifugación con gradiente de yodixanol del sobrenadante de cultivo concentrado. Los vectores de VAA producidos con el nuevo proceso demuestran una transducción equivalente o mejor tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se comparan con vectores purificados con un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) obtenidos a pequeña escala. Además, el proceso de purificación con gradiente de yodixanol descrito separa eficazmente partículas de vector funcional de las cápsides vacías, una propiedad deseable para reducir la toxicidad y las respuestas inmunitarias no deseadas durante los estudios preclínicos.

Recientemente se ha observado que, a diferencia del VAA2, la mayoría de otros serotipos de VAA se liberan principalmente en el medio de los cultivos de producción transfectados con fosfato de calcio y no se retienen en el lisado celular (Vandenberghe, L. H., Lock, M., Xiao, R., Lin, J., Korn, M., y Wilson, J. M. 2010). La liberación de VAA dependiente de heparina en el sobrenadante simplifica la fabricación. Presentado y ahora publicado como "Efficient serotype-dependent Release of Functional Vector into the Culture Medium During Adeno-Associated Virus Manufacturing", *Hum Gene Ther*, 21: 1251-1257 (octubre 2010).

Puede utilizarse un método de producción de VAA a escala adecuado para estudios animales amplios, que se basa en la transfección con PEI y recogida de sobrenadante. El método tiene alto rendimiento y es versátil para la producción de vectores con diferentes serotipos y transgenes, y lo suficientemente fácil para que pueda realizarse en la mayoría de los laboratorios con un mínimo de técnicas y equipos especializados. Este método se publica ahora en Lock *et al*, *Hum Gen Ther*, octubre de 2010; 21 (10): 1259-71.

Referencias

- Atkinson, M. A., Fung, V. P., Wilkins, P. C., Takeya, R., K, Reynolds, T. C., y Aranha, I. L. 2005. Methods for generating high titer helper free preparations of release recombinant VAA vectors. US Published Patent Application No. 2005/0266567.
- Auricchio, A., Hildinger, M., O'Connor, E., Gao, G. P., y Wilson, J. M. 2001. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single step gravity-flow column. *Hum Gene Ther* 12(1): 71-76.
- Brantly, M. L., Chulay, J. D., Wang, L., Mueller, C., Humphries, M., Spencer, L. T., Rouhani, F., Conlon, T. J., Calcedo, R., Betts, M. R. 2009. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of VAAr1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(38): 16363-16368.
- Brument, N., Morenweiser, R., Blouin, V., Toubanc, E., Raimbaud, L., Cherel, Y., Folliot, S., Gaden, F., Boulanger, P., Kroner-Lux, G. 2002. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Mol Ther* 6(5): 678-686.
- Clement, N., Knop, D. R., y Byrne, B. J. 2009. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther* 20(8): 796-806.
- Davidoff, A.M., Ng, C. Y., Sleep, S., Gray, J., Azam, S., Zhao, Y., McIntosh, J. H., Karimipoor, M., y Nathwani, A. C. 2004. Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *J Virol Methods* 121(2): 209-215.
- Durocher, Y., Pham, P. L., St-Laurent, G., Jacob, D., Cass, B., Chahal, P., Lau, C. J., Nalbantoglu, J., y Kamen, A. 2007. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *J Virol Methods* 144(1-2): 32-40.
- Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., y Wilson, J. M. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(18): 11854-11859.
- Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., y Kleinschmidt, I. A. 1998. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9(18): 2745-2760.
- Hermens, W. T., Dijkhuizen, P. A., Sonnemans, M. A., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A., y Verhaagen, J. 1999. Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* 10(11): 1885-1891.

- Hildinger, M., Baldi, L., Stettler, M., y Wurm, F. M. 2007. High-titer, serum free production of adeno-associated virus vectors by polyethyleneimine-mediated plasmid transfection in mammalian suspension cells. *Biotechnol Lett* 29(11): 1713-1721.
- 5 Kaludov, N., Handelman, B., y Chiorini, J. A., 2002. Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* 13(10): 1235-1243.
- Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K. A., Testa, F., Surace, E. M. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21): 2240-2248.
- 10 Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y., y Colosi, P. 1998. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5(7): 938-945.
- Moss, RB., Rodman, D., Spencer, L. T., Aitken, M. L., Zeitlin, P. L., Waltz, D., MiHa, C., Brody, A.S., Clancy, J. P., Ramsey, B. 2004. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125(2): 509-521.
- 15 Mueller, C. y Flotte, T. R 2008. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 15(11): 858-863.
- Neinhuis, A. 2009. Dose-Escalation Study Of A Self Complementary Adeno-Associated Viral Vector For Gene Transfer in Hemophilia B.
- 20 Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H., Nitahara-Kasahara, Y., Takeda, S., y Ozawa, K. 2009. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (VAA1) and VAA8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther* 20(9): 1013-1021.
- Qu, G., Bahr-Davidson, J., Prado, J., Tai, A., Cataniag, F., McDonnell, J., Zhou, J., Hauck, B., Luna, J., Sommer, J. M. 2007. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *J Virol Methods* 140(1-2): 183-192.
- 25 Salvetti, A., Oreve, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J., y Moullier, P. 1998. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 9(5): 695-706.
- Schroder, M., Schafer, R, y Friedl, P. 1997. Spectrophotometric determination of iodixanol in subcellular fractions of mammalian cells. *Anal Biochem* 244(1): 174-176.
- 30 Smith, R. H., Levy, J. R., y Kotin, R.M. 2009. A simplified baculovirus-VAA expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer VAAr stocks from insect cells. *Mol Ther* 17(11): 1888-1896.
- Snyder, RO. y Flotte, T. R 2002. Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* 13(5): 418-423.
- Sommer, J. M., Smith, P. H., Parthasarathy, S., Isaacs, J., Vijay, S., Kieran, J., Powell, S. K., McClelland, A., y Wright, J. F. 2003. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Mol Ther* 7(1): 122-128.
- 35 Vandenberghe, L. H., Lock, M., Xiao, R., Lin, J., Korn, M., y Wilson, J. M. 2010. Heparin-dependent release of VAA into the supernatant simplifies manufacturing. Submitted, and now published as "Efficient serotype-dependent Release of Functional Vector into the Culture Medium During Adeno-Associated Virus Manufacturing", *Hum Gene Ther*, 21: 1251-1257 (octubre 2010).
- 40 Virag, T., Cecchini, S., y Kotin, R. M. 2009. Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus insect cell expression strategy. *Hum Gene Ther* 20(8): 807-817.
- Wang, L., Wang, H., Bell, P., McCarter, R. J., He, 1, Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Morizono, H., Batshaw, M. L., y Wilson, J. M. 2010. Systematic evaluation of VAA vectors for liver directed gene transfer in murine models. *Mol Ther* 18(1): 118-125.
- 45 Warrington, K. H., Jr. y Herzog, R. W. 2006. Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* 119(6): 571-603.
- Wright, J. F. 2009. Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production. *Hum Gene Ther* 20(7): 698-706.
- 50 Wright, J. F., Le, T., Prado, J., Bahr-Davidson, J., Smith, P. H., Zhen, Z., Sommer, J. M., Pierce, G. F., y Qu, G. 2005. Identification of factors that contribute to recombinant VAA2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Mol Ther* 12(1): 171-178.
- Xiao, X., Li, J., y Samulski, R. J. 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72(3): 2224-2232.
- 55 Zhang, H., Xie, J., Xie, Q., Wilson, J. M., y Gao, G. 2009. Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 20(9): 922-929.
- Zolotukhin, S., Byrne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R. J., y Muzyczka, N. 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6(6): 973-985.
- 60 Zolotukhin, S., Potter, M., Zolotukhin, I., Sakai, Y., Loiler, S., Fraites, T. J., Jr., Chiodo, V. A., Phillipsberg, T., Muzyczka, N., Hauswirth, W. W. 2002. Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28(2): 158-167.

7. EJEMPLO 2: PURIFICACIÓN CON CESIO DE VECTORES DE VAA

- 65 Este ejemplo describe un nuevo procedimiento de purificación con cloruro de cesio (CsCl) de vectores de VAA a partir de sedimentos celulares transfectados.

Día 1 - Procesamiento del sedimento y centrifugación con CsCl

1) Preparación del lisado

- 5 • Descongelar las células congeladas a -80 °C durante 15 minutos a 37 °C.
- Resuspender el sedimento celular en ~ 20 ml de Tampón de Resuspensión 1 (Tris 50 mM, pH 8,2, MgCl 2 mM) para 40 placas de células y para un volumen final de 20 ml, y colocar en hielo.
- Congelar/descongelar 3 veces (baño de hielo seco y etanol/baño de agua a 37 °C).
- 10 • Añadir 100 µl de Benzonasa (250 U/ml) por prep e invertir suavemente, incubar las muestras a 37 °C durante 20 minutos, invertir el tubo cada 5 minutos.
- Añadir 6 ml de NaCl 5 M para llevar la concentración salina final a 1 M. Mezclar.
- Centrifugar a 8.000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Sorval. Nota: asegurarse de que la Sorval está limpia. Después de la centrifugación, esterilizar el tubo con 70 % antes de seguir adelante. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 15 • Centrifugar de nuevo a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en Sorval. Nota: asegurarse de que la Sorval está limpia. Después de la centrifugación, esterilizar el tubo con 70 % antes de seguir adelante.
- Añadir 1,8 ml de OGP al 10 % para obtener una concentración final de 0,5 %, y mezclar suavemente mediante inversión.

20 2) Etapa de purificación en gradiente con cloruro de sodio

- Para cada preparación, preparar dos gradientes de 2 niveles que consisten en 7,5 ml de CsCl 1,5 g/ml y 15 ml de CsCl 1,3 g/ml en tubos Beckman SW-28 (no usar tubos ultratransparentes). Cargar primero el CsCl menos denso y después cargar en la parte inferior el CsCl más pesado.
- 25 • Añadir 15 ml de muestra a la parte superior de cada gradiente. Añadir lentamente la muestra en la parte lateral del tubo para no alterar el gradiente. Etiquetar los tubos con lote n.º.
- Centrifugar a 25.000 rpm a 15 °C durante 20 horas como mínimo.

30 Día 2 – Recogida de la banda de VAA de la primera centrifugación de CsCl y configuración de la segunda centrifugación con CsCl

1) Recogida de la banda de la centrifugación de CsCl

- 35 • Retirar cuidadosamente los tubos de centrífuga (A y B) de la cubeta, teniendo cuidado de no alterar el gradiente. Asegurar el primer tubo (A) en un soporte de tubos.
- Tomar una longitud de 0,61 m de tubo de silicona Tygon previamente esterilizado (diámetro interno 1,6 mm; Fisher NC9422080) ajustado con dos luer macho de 1,59 mm (Fisher NC9507090) e insertar agujas de calibre 18 1" en los luer.
- 40 • Perforar el tubo en un ángulo recto tan cerca de la parte inferior como sea posible con una de las agujas de calibre 18 1" (bisel orientado hacia arriba) y sujetar el tubo en los rodillos de carga fácil de la bomba Masterflex. Aumentar suavemente la velocidad a ~ 1 ml/min. Recoger los 4,5 ml primeros en un tubo Falcon de 15 ml y después comenzar recogiendo las fracciones (250 µl) en una placa de 96 pocillos (del tubo A). Recoger 48 fracciones.
- 45 • Procesar el resto del gradiente en un vaso de precipitados que contiene una solución blanqueadora al 20 % y retirar el conjunto de aguja/tubo.
- Tomar otra longitud de 0,61 m de tubo de silicona Tygon previamente esterilizado (1,6 mm de diámetro interno; Fisher NC9422080) ajustado con dos luer macho de 1,59 mm (Fisher NC9507090) e insertar agujas de calibre 18 1" en los luer para recoger las fracciones del segundo tubo (del tubo B).
- 50 • Repetir toda la recogida del tubo B. Retirar el conjunto de aguja/tubo después de su uso:

2) Lectura del índice de refracción (IR)

- 55 • Usando una pipeta multicanal, transferir 10 µl de cada fracción (de las 48 recogidas, primero desde la placa A de 96 pocillos) a una placa limpia (etiquetada con 1 a 48) y dejar el resto de las fracciones en la cabina de bioseguridad.
- Tomar 5 µl de cada fracción y leer el IR usando un refractómetro. Las fracciones que contienen VAA deben tener un índice de refracción de 1,3740-1,3660. Leer el IR justo hasta 1,3650 y después agrupar las fracciones en la cabina de bioseguridad con un IR en el intervalo de 1,3740 a 1,3660. (Medir el volumen total después de agrupar las placas de 96 pocillos que pertenecen al tubo 1 y 2. En casos en los que haya algún espacio para añadir más, añadir desde los pocillos con una IR de 1,375.)
- 60 • Repetir este proceso para la segunda placa de 96 pocillos (del tubo B).

3) Carga del segundo gradiente

- El volumen agrupado total de cada gradiente (de los tubos A y B) debe ser 5-6 ml. Agrupar los dos gradientes recogidos en un tubo Falcon de 50 ml y llevar el volumen a 13 ml con una solución 1,41 g/ml de CsCl. Mezclar bien con una pipeta.
- 5 • Usando una jeringa de 10 ml y una aguja de calibre 18, añadir el primer gradiente agrupado recogido a un tubo de centrífuga de 13 ml con cierre. La solución debe añadirse hasta la línea del cuello del tubo sin burbujas.
- Sellar el tubo usando el sellador portátil, tapones para tubo de metal y dissipador de calor.
- Apretar el tubo para verificar que no haya filtraciones y después colocar en un rotor Ti70.1 con el equilibrio apropiado. Insertar las tapas del rotor y tapar y después centrifugar a 60.000 rpm, a 15 °C durante 20 horas.

- 10 Día 3 – Recogida de la banda de VAA de la 2ª centrifugación de CsCl y desalinización

- 1) Recogida de la banda de la centrifugación con CsCl

- Retirar cuidadosamente el tubo de centrífuga de la cubeta, teniendo cuidado de no alterar el gradiente. Fijar el tubo en un soporte de tubos. En este momento sería visible una sola banda después de iluminar la parte inferior aproximadamente en la mitad del tubo.

- 15 • Tomar una longitud de 0,61 m de tubo de silicona Tygon previamente esterilizado (diámetro interno 1,6 mm; Fisher NC9422080) ajustado con dos luer macho de 1,59 mm (Fisher NC9507090) e insertar agujas de calibre 18 1" en los luer. Usar una longitud de tubo por preparación.
- 20 • Perforar el tubo a un ángulo recto tan cerca como sea posible del fondo con una de las agujas de calibre 18 1" (con el bisel orientado hacia arriba) y sujetar el tubo en los rodillos de carga fácil de la bomba Masterflex. Perforar de nuevo el tubo en la parte superior con una segunda aguja de calibre 18. Aumentar suavemente la temperatura a ~ 1 ml/min y después comenzar a recoger las fracciones (250 µl) en una placa de 96 pocillos.
- 25 Recoger todo el gradiente (~45 fracciones).

- 2) Lectura del índice de refracción (IR)

- Usando una pipeta multicanal, transferir 10 µl de cada fracción a una placa limpia y dejar el resto de las fracciones en la cabina de bioseguridad.
- 30 • Tomar 5 µl de cada fracción y leer el IR usando un refractómetro. Las fracciones que contienen VAA deben tener un índice de refracción de 1,3750-1,3660. Leer el IR justo hasta 1,3650, y después agrupar las fracciones con un IR en el intervalo de 1,3750 a 1,3660.

- 35 3) Desalinización: concentradores de centrífuga Amicon Ultra-I 5

- En este procedimiento, el vector se diluye con PBS y se centrifuga a una baja velocidad a través de un dispositivo de filtro MWCO de 100 kDa. Debido al gran peso molecular de las Partículas de VAA (~5000 kDa), el vector queda retenido en la membrana y la sal pasa a su través. El vector puede construirse en las membranas, aclarando si se requiere en la fase final.

- 40 • Dividir partes alícuotas de 50 ml de PBS + NaCl 35 mM en un tubo de 50 ml.
- Diluir las fracciones agrupadas de la etapa 2 anterior con PBS + NaCl 35 mM a un volumen total de 15 ml. Mezclar suavemente y añadir a un dispositivo de filtro Amicon.
- 45 • Centrifugar en una centrífuga Sorvall de mesa a una velocidad de 2.000 a 4.000 rpm durante 2 minutos. Dado que es importante mantener el nivel del líquido por encima de la parte superior de la superficie del filtro (~1,8 ml) todo el tiempo de manera que el vector no se seque en la membrana, se recomienda intentar primero la centrifugación a una velocidad más baja para determinar el caudal de la muestra. El objetivo es reducir el volumen del retenido a ~1,8 ml. Puede ser necesaria una centrifugación corta adicional para conseguir esto. Si el volumen queda por debajo de lo deseado, llevar de nuevo a 1,8 ml con PBS + NaCl 35 mM.
- 50 • Añadir 13,2 ml más de PBS + NaCl 35 mM, mezclar con una pipeta, mateniendo el retenido en el dispositivo y repetir el proceso de centrifugación descrito anteriormente. Continuar este proceso hasta que todas las alícuotas de 50 ml de PBS + NaCl 35 mM, divididas en alícuotas previamente, se centrifuguen en el dispositivo.
- Aclarar la membrana con el retenido final (~1,8 ml) pipeteando repetidamente frente a toda la superficie. Recuperar el retenido en un tubo de centrífuga estéril de tamaño adecuado usando puntas de Eppendorf de 1 ml y 200 µl (la punta de 200 µl es para el retenido final en la parte inferior del dispositivo que es inaccesible para una punta de 1 ml). Aclarar la membrana dos veces usando un mínimo de 100 µl de PBS + NaCl 35 mM y agruparlo con su retenido final.
- 55 • Determinar el volumen exacto y añadir glicerol al 5 %.
- Dividir en alícuotas en 5 x 25 µl, 1 x 100 µl para su archivo, y el resto en alícuotas de 105 µl.
- 60 • Congelar inmediatamente a -80 °C.

Reactivos usados para la purificación de VAAr

- Tampón de resuspensión 1 [Tris 50 mM (pH 8,0), MgCl 2 mM]: 50 ml de Tris 1 M (pH 8,0), MgCl 2 ml/M en 948 ml de agua MQ, esterilizar con filtro.
- Soluciones de CsCl 1,5 g/ml: disolver 675 g de CsCl en 650 ml de PBS y ajustar el volumen final a 1000 ml. Pesar 1 ml de la solución para verificar la densidad. Esterilizar por filtración la solución.
- 5 • Soluciones de CsCl 1,3 g/ml: disolver 405 g de CsCl en 906 ml de PBS y ajustar el volumen final a 1000 ml. Pesar 1 ml de la solución para comprobar la densidad. Esterilizar con filtración la solución.
- Octil-PD-glucopiranosido (OGP) al 10 % (P/V) (Sigma, 08001-10G): llevar 10 gramos a 100 ml con agua milliQ. Esterilizar por filtración la solución.
- Tampón de formulación final: PBS + NaCl 35 mM. A 1 litro de PBS estéril, añadir 7,05 ml de NaCl 5 M estéril.
- 10 • Glicerol estéril: dividir en alícuotas glicerol en frascos de vidrio de 100 ml. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos en un ciclo líquido.

8. EJEMPLO 3: CONSTRUCCIONES DE ADN PARA LA PREPARACIÓN DE VECTORES DE VAA PITA

15 La invención se ilustra con los Ejemplos 3-5, que demuestran la estrecha regulación de la expresión del ablacionador usando rapamicina, para dimerizar los dominios de factor de transcripción que inducen la expresión de la Cre recombinasa; y la ablación inducible satisfactoria de un transgén que contiene sitios de reconocimiento Cre (loxP) en células. La regulación estrecha de la expresión del ablacionador se demuestra en modelos con animales.

20 Lo que se indica a continuación son ejemplos de construcciones de ADN y su uso para generar vectores de VAA con replicación defectuosa para su uso de acuerdo con el sistema PITA de la invención ilustrado en los ejemplos a continuación.

25 8.1. Construcciones que codifican una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación

Las Figuras 1A-B a las Figuras 5B son diagramas de las siguientes construcciones de ADN que pueden usarse para generar vectores VAA que codifican una unidad de dominio del factor de transcripción dimerizable y una unidad de ablación: (1) pVAA.CMV.TF.FRB-ILRES-1xFKBP.Cre (Figs. 1A-B); (2) pVAA.CMV.TF.FRB-T2A-2xFKBP.Cre (Figs. 2A-B); (3) pVAA.CMV173.TF.FRB-T2A-3xFKBP.Cre (Figs. 3A-B); y (4) pVAA.CMV.TF.FRB-T2A-2xFKBP.ISce-I (Figs. 4A-B).

Una descripción de los diversos dominios contenidos en las construcciones de ADN es la siguiente:

35 ITR: repeticiones terminales invertidas de VAA serotipo 2 (168 pb). [SEC ID N°: 26]

CMV: promotor de citomegalovirus (CMV) completo; incluyendo el potenciador. [SEC ID N°: 27]

40 CMV (173 pb): promotor de CMV mínimo, que no incluye potenciador. [SEC ID N°: 28]

Fusión FRB-TA: fusión del dominio de unión dimerizador y un dominio de activación de un factor de transcripción (900 pb, SEC ID N°: 29). La proteína se proporciona en el presente documento como SEC ID N°: 30. El fragmento FRB corresponde a los aminoácidos 2021-2113 de FRAP (proteína asociada a rapamicina FKBP, también conocida como mTOR [diana de rapamicina de mamíferos]), un homólogo de la fosfoinosítido 3-quinasa que controla el crecimiento y la división celular. La secuencia FRAP incorpora la mutación puntual sencilla Thr2098Leu (FRAP_L) que permite el uso de determinados análogos de rapamicina (rapálogos) no inmunosupresores. FRAP se une a rapamicina (o a sus análogos) y a FKBP y se fusiona con una parte del p65 de NF-KB humano (190 aminoácidos) como activador de la transcripción.

50 Fusión ZFHD-FKBP: fusión de un dominio de unión a ADN y 1 copia de un dominio de unión dimerizador (1xFKBP; 732 pb), 2 copias de dominio de unión a fármaco (2xFKBP; 1059 pb), o 3 copias (3xFKBP; 1389 pb) de dominio de unión a fármaco. La inmunofilina FKBP (proteína de unión a FK506) es una proteína citoplasmática abundante de 12 kDa que actúa como el receptor intracelular para los fármacos inmunosupresores FK506 y rapamicina. ZFHD es un dominio de unión a ADN compuesto de un par de dedos de cinc y un homeodominio. Ambas proteínas de fusión contienen una secuencia de localización nuclear N terminal desde c-Myc humano al extremo 5'. Véase, SEC ID N°: 45.

T2A: péptido 2A de autoescisión (54 pb) (SEC ID N°: 31).

60 Z8I: 8 copias del sitio de unión para ZFHD (Z8) seguido de un promotor mínimo para el gen de interleucina-2 (IL-2) humana (SEC ID N°: 32). Pueden usarse variantes de este promotor, por ejemplo, que contengan de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 copias del sitio de unión de ZFHD seguido por un promotor, por ejemplo, el promotor mínimo de IL-2.

Cre: Cre recombinasa. Cre es una topoisomerasa de tipo I aislada del bacteriófago P1. Cre actúa como mediador en la recombinación específica de sitio en el ADN entre dos sitios loxP, lo que conduce a la delección o conversión del gen (1029 pb, SEC ID N°: 33).

I-SceI: un miembro de endonucleasas intrón o endonucleasas de movimiento dirigido (*homing*) que es una clase de meganucleasas grandes (708 pb, SEC ID N°: 34). Están codificadas por elementos genéticos móviles tales como intrones encontrados en bacterias y plantas. I-SceI es una endonucleasa de levadura implicada en un proceso de movimiento dirigido intrónico. I-SceI reconoce un elemento de 18 pb asimétrico específico, una secuencia poco frecuente en el genoma de mamíferos, y crea roturas bicatenarias. Véase, Jasin, M. (1996) Trends Genet., 12, 224-228.

hGH poli A: señal de poliadenilación mínima de la GH (hormona del crecimiento) humana (SEC ID N°: 35).

IRES: secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma del VECM (virus de la encefalomiocarditis) (SEC ID N°: 36).

8.2. Construcciones que codifican unidades transgénicas

Las Figuras 5A-B y Figs. 6A-B son diagramas de las siguientes construcciones de ADN para generar un vector basado en VAA que codifica un transgén flanqueado por sitios de reconocimiento loxP para Cre recombinasa:

(1) pENN.CMV.PI.loxP.Luc.SV40 (Figs. 5A-B); y (2) pENN.CMV.PI.sce.Luc.SV40 (Figs. 6A-B). Una descripción de los diversos dominios de las construcciones es la siguiente:

ITR: repeticiones terminales invertidas del VAA serotipo 2 (SEC ID N°: 26).

CMV: promotor de citomegalovirus (CMV) y potenciador que regula la expresión de genes tempranos inmediatos (832 pb, SEC ID N°: 27).

loxP: secuencias de reconocimiento de Cre. Es un elemento de 34 pb que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pb que flanquean una región de 8 pb que confiere orientación (34 pb, SEC ID N°: 37).

FfLuciferasa: luciferasa de luciérnaga (*fire fly luciferase*) (1656 pb, SEC ID N°: 38).

SV 40: señal de poliadenilación tardía (239 pb, SEC ID N°: 39).

Sitio I-SceI: sitio de reconocimiento SceI (18 pb, SEC ID N°: 25).

8.3. Construcciones que codifican una unidad transgénica y una unidad de dominio del factor de transcripción dimerizable

La Figura 7 es un diagrama de construcciones de ADN para generar un vector VAA que contiene una unidad transgénica y una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable. Este plásmido proporciona, en su estructura de plásmido VAA que contiene un gen de resistencia a ampicilina, una ITR 5' VAA, una unidad de dominio de factor de transcripción (FT), un promotor CMV, un FRB (aminoácidos 2021-2113 de FRAP (proteína asociada a rapamicina FKBP, también conocida como mTOR [diana de rapamicina de mamíferos]), un homólogo de fosfoinositida 3 quinasa que controla el crecimiento y la división celular), un dominio T2A de autoescisión, un dominio FKBP y un sitio poliA de la hormona del crecimiento humano, un promotor de CMV, un sitio loxP, una secuencia que codifica alfa interferón, y un sitio poliA de SV40. La unidad de ablación (casete de expresión cre) puede localizarse en una construcción distinta. Esta estrategia puede minimizar cualquier posible expresión del nivel de fondo de cre procedente del promotor de CMV aguas arriba.

9. EJEMPLO 4: MODELO *IN VITRO* PARA PITA

Este ejemplo demuestra que los elementos (unidades) de ADN modificados por ingeniería genética en los vectores VAA consiguen satisfactoriamente la ablación inducible fuertemente controlada del transgén en las células. En particular, este ejemplo demuestra que la ablación de la expresión del transgén de luciferasa puede realizarse después de tratamiento con dimerizador (rapamicina) de células infectadas con construcciones que contienen una unidad transgénica (que expresa luciferasa y que contiene sitios lox p), una unidad de ablación (que expresa Cre) y una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable.

Células 293 de fibroblasto de riñón embrionario humano se sembraron en placas de 12 pocillos. La transfección de las células con diversas construcciones de ADN descrita en la sección 9.1 del presente documento se realizó al siguiente día cuando la densidad celular alcanzó una confluencia del 90 % usando Lipofectamine 2000 adquirida en Invitrogen. Se añadió un vector que codificaba la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) a 10 % de un total de ADN en cada pocillo para servir como control interno para la transcripción. El ADN suspendido en DMEM se mezcló con Lipofectamine 2000 para formar un complejo ADN-lípido y se añadió a células 293 para la transfección

siguiendo las instrucciones proporcionadas por Invitrogen Corporation. A las 6 horas post-transfección, la mitad de los pocillos se trataron con rapamicina a una concentración final de 50 nM. El medio de cultivo (DMEM complementado con FBS al 10 %) se reemplazó diariamente con rapamicina reciente. A las 48 y 72 horas post-transfección, las células se lavaron una vez con PBS y después se rasaron del pocillo resuspendido en tampón de lisis proporcionado en el kit de ensayo Luciferasa adquirido en Promega. La suspensión celular se sometió a agitación vortical y los desechos se centrifugaron. La actividad luciferasa se determinó mezclando 10 µl del lisado con 100 µl del sustrato y se leyó la emisión de luz por segundo con un luminómetro.

9.1. CONSTRUCCIONES

Las siguientes construcciones, la mayoría de ellas descritas en la Sección 8, Ejemplo 1, se usaron para generar vectores VAA infecciosos, con replicación defectuosa:

1. pENN.VAA.CMV.RBG como un control, que contiene un promotor CMV y no contiene transgén
2. pENN.CMV.PI.loxP.Luc.SV40 (Figs. 5A-B)/pENN.VAA.CMV.RBG (promotor CMV y sin transgén)
3. pENN.CMV.PI.loxP.Luc.SV40(Figs. 5A-B)/ pVAA.TF.CMV.FRB-T2A-2xFKBP.Cre (Figs. 2A-B)
4. pENN.CMV.PI.loxP.Luc.SV40(Figs. 5A-B)/pVAA.TF.CMV.FRB-IRES-FKBP.Cre (Figs. 1A-B)
5. pENN.CMV.PI.loxP.Luc.SV40(Figs. 5A-B)/ pVAA.CMV173.FRB-T2A-3xFKBP.Cre (Figs. 3A-B)
6. pENN.CMV.PI.loxP.Luc.SV40(Figs. 5A-B)/pENN.VAA.CMV.PI.Cre.RBG, que expresa el gen Cre a partir de un promotor constitutivo

9.2. RESULTADOS

En la Figura 8A se muestran los resultados a las 48 horas y los resultados a las 72 horas se muestran en la Figura 8B. En el control (tratamiento 6), en el que se expresa Cre de manera constitutiva, se realizó la ablación de la expresión de luciferasa independientemente de la rapamicina en comparación con la expresión control de luciferasa sin sitios loxP (tratamiento 2, células transfectadas con construcción luciferasa). Por otro lado, en las células que reciben loxP que flanquea las construcciones de luciferasa más una de las construcciones que llevan Cre bajo el control del sistema PITA (tratamiento 3, 4 y 5), el nivel de la expresión del gen indicador es comparable al del control en ausencia de dimerizador, rapamicina, indicando una expresión muy pequeña o ninguna de Cre inducida. Sin embargo, después de la inducción por tratamiento con rapamicina, el nivel de la expresión del gen indicador en las células que reciben construcciones de Cre controladas por PITA se redujo significativamente en comparación con el control (tratamiento 2), lo que indica que se activa la expresión de Cre. Los resultados confirman que la expresión del ablacionador está específicamente regulada por el dimerizador, la rapamicina.

10. EJEMPLO 5: MODELO *IN VIVO* PARA UN SISTEMA INDUCIBLE DIMERIZADOR

Este ejemplo muestra un control específico de tejido estrecho de la expresión transgénica usando un promotor específico de hígado que se regula por el sistema inducible dimerizador descrito en el presente documento. Estos datos sirven como un modelo para una regulación estrecha del ablacionador en el sistema PITA.

Cuatro grupos de tres ratones recibieron inyección IV de vectores VAA que codifican los genes indicadores bicistrónicos (GFP-Luciferasa) a dosis de 3×10^{10} , 1×10^{11} y 3×10^{11} partículas de virus, respectivamente: el Grupo 1 (G1, G2 y G3) recibió vectores VAA que expresaban GFP Luciferasa bajo el control del promotor CMV constitutivo ubicuo (véase la Figura 9A para un diagrama de la construcción de ADN). El Grupo 2 (G4, G5 y G6) recibió co-inyección de los 2 siguientes vectores VAA: (1) vector VAA que expresa una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable (FRB fusionada con el dominio de activación p65 y un dominio de unión al ADN ZFHD fusionado con 3 copias de FKBP) conducido por el promotor CMV (la construcción de ADN mostrada en la Figura 2B; y (2) vector VAA que expresa GFP-Luciferasa dirigida por un promotor inducido por el TF dimerizado (véase la Figura 12C para un diagrama de las construcciones de ADN). El Grupo 3 (G7, G8 y G9) recibió un vector VAA que expresa GFP-Luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo de hígado, TBG (véase la Figura 9C para un diagrama de la construcción de ADN). El Grupo 4 (G10, G11, G12) recibió coinyección de los 2 siguientes vectores VAA: (1) vector VAA que expresa una unidad de dominio de factor de transcripción dimerizable (FRB fusionada con el dominio de activación p65 y dominio de unión a ADN ZFHD fusionado con 3 copias de FKBP) conducido por el promotor TBG; y (2) vector VAA que expresa GFP-Luciferasa conducido por un promotor inducido por el TF dimerizado (véase Figura 9D para un diagrama de las construcciones de ADN).

Aproximadamente 2 semanas después de la administración del virus, los ratones recibieron una inyección IP del dimerizador, rapamicina, a la dosis de 2 mg/kg. Empezando al siguiente día la expresión de luciferasa se monitorizó mediante análisis de formación de imágenes Xenogen. Aproximadamente 24 horas después de la inyección con rapamicina, los ratones recibieron inyección IP de luciferina, sustrato para luciferasa, después se anestesiaron para realizar la formación de imágenes.

Los ratones que recibieron 3×10^{11} partículas de virus dieron lugar a imágenes tomadas 30 minutos después de la inyección con luciferina (Figs. 10A-D). Para el Grupo 1 los ratones que recibieron vectores que llevaban GFP-Luciferasa, la expresión conducida por el promotor CMV, la expresión de luciferasa se observó en diversos tejidos y

predominantemente en pulmones, hígado y músculo (véase Fig 10A). Por otro lado, la expresión de luciferasa se limitó al hígado en el Grupo 3 de ratones que recibió vector luciferasa en el que la expresión se controló con el promotor TBG (véase Fig 10B). En el Grupo 2 de ratones, el nivel de expresión de luciferasa se elevó a más de 2 logs en comparación con el nivel de preinducción y la expresión es predominantemente en hígado y músculo (véase Fig. 10C). En el Grupo 4 de ratones, se indujo en más de 100 veces la expresión de luciferasa y se limitó en el hígado en comparación con la preinducción (véase Fig. 10D).

Los ratones que recibieron 1×10^{11} partículas de virus, mostraron resultados similares a los de los grupos con una dosis elevada pero con un menor nivel de expresión después de la inducción, y predominantemente en el hígado (véanse las Figs. 11A-D).

CONCLUSIONES:

1. El sistema inducible dimerizador es fuerte con un nivel pico de expresión de luciferasa de más de 2 logs sobre el nivel inicial y de nuevo cercano al nivel inicial al cabo de una semana (no mostrado).
2. El hígado es el tejido más eficaz para ser infectado cuando los virus se proporcionan por vía IV.
3. El hígado es el tejido más eficaz para transducirse conjuntamente con 2 virus, lo que es crítico para que funcione el sistema inducible dimerizador.
4. La expresión de la luciferasa regulada por ese sistema inducible dimerizador con la expresión del factor de transcripción controlada por el promotor CMV es significativamente más elevada en hígado de ratón que la expresión que procede del promotor CMV sin regulación. Esto indica que el promotor inducible es un promotor más fuerte en el hígado una vez se activa en comparación con el promotor CMV.
5. La expresión de luciferasa se detectó específicamente en hígado tras la inducción con rapamicina en ratones que recibieron vectores portadores del sistema promotor TBG inducible. La expresión de luciferasa mediada por los vectores regulables específicos de hígado era completamente dependiente de la inducción por rapamicina y el nivel pico de la expresión de luciferasa es comparable al que está bajo el control del promotor TBG. Este estudio confirma que la regulación génica específica de hígado puede conseguirse mediante una administración génica mediada por VAA de un sistema inducible dimerizador específico de hígado.

11. EJEMPLO 6: PITA PARA TERAPIA DE DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD (AMD)

La administración intravítrea de un anticuerpo monoclonal ha demostrado ser una terapia eficaz para la AMD para ralentizar la progresión de la enfermedad y mejorar la agudeza visual en una subpoblación de pacientes. Sin embargo, una limitación clave de esta estrategia es la necesidad de inyecciones intravítreas repetidas. La terapia génica tiene la posibilidad de demostrar la corrección prolongada y una sola inyección debe ser suficiente para conseguir un efecto terapéutico. Las Figuras 12A-C muestran construcciones de ADN PITA para el tratamiento de la AMD, que contiene unidades transgénicas que comprenden un antagonista de VEGF, tal como un anticuerpo anti-VEGF (cadena pesada Avastín (AvastínH) y cadena ligera Avastín (AvastínL); Figuras 12B y 12C) o un receptor VEGF soluble (sFlt-1; Figura 12A). Los vectores que comprenden estas construcciones de ADN pueden administrarse mediante inyección sub-retinal a una dosis de 0,1-10 mg/kg. La ablación de la expresión transgénica puede realizarse por administración oral del dimerizador si se observan efectos adversos de la terapia anti VEGF prolongada.

12. EJEMPLO 7: PITA PARA TERAPIA DE ENFERMEDAD METABÓLICA HEPÁTICA

PITA es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades metabólicas hepáticas tales como la hepatitis C y la hemofilia. La Figura 13A muestra una construcción PITA para el tratamiento de la hemofilia A y/o B, que contiene una unidad transgénica que comprende el Factor IX. También puede administrarse el Factor VIII para el tratamiento de hemofilia A y B respectivamente (Factor VIII y IX para hemofilia A y B, respectivamente). En pacientes en los que se produce la formación del inhibidor puede realizarse una terapia de ablación. La Figura 13B muestra una construcción PITA para administrar ARNhp que se dirige al IRES del VHC. Un vector que comprende esta construcción puede inyectarse mediante un afluente mesentérico de la vena porta a la dosis de 3×10^{12} CG/kg. La ablación de la expresión de ARNhp puede realizarse si aparece toxicidad no específica del ARN de interferencia o si la terapia no se necesita más.

13. EJEMPLO 8: PITA PARA TERAPIA DE ENFERMEDAD CARDIACA

PITA puede utilizarse para aplicaciones de enfermedades cardíacas incluyendo, pero sin limitación, disfunción cardíaca congestiva (CHF) e infarto de miocardio (MI). El tratamiento de CHF implicaría la administración del factor de crecimiento insulínico (IGF) o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) usando las construcciones mostradas en las Figuras 14A y 14B. Para el tratamiento de infarto de miocardio, la administración de genes en las fases tempranas de MI puede proteger al corazón de los efectos perjudiciales de isquemia pero permitir la ablación de la terapia cuando ya no se requiera más. Los genes terapéuticos para esta estrategia incluyen hemooxigenasa-1 (HO-1) que pueden actuar para limitar el grado de lesión isquémica. Los métodos de administración para la administración génica mediada por vectores al corazón incluyen técnicas de derivación transcutánea, intravascular, intramuscular y cardiopulmonar. Para los seres humanos, el protocolo de administración de genes mediado por

vector óptimo podría posiblemente utilizar administración coronaria retrógrada o anterógrada trans en la arteria coronaria o en la vena cardíaca anterior.

14. EJEMPLO 9: PITA PARA TERAPIA DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Los candidatos atractivos para la aplicación de PITA en el sistema nervioso central incluyen factores neurotróficos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington y enfermedades oculares. La Figura 15 muestra una construcción PITA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que contiene una unidad transgénica que comprende un factor de crecimiento nervioso (NGF). La administración génica mediada por vectores VAA de NGF es actualmente estudiada en un ensayo clínico de Fase I realizada por Ceregene para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. El NGF es un factor neurotrófico, que se ha observado que es eficaz en la reducción de la pérdida de células colinérgicas en modelos animales de enfermedad neurodegenerativa y puede ser eficaz en la prevención de la pérdida de memoria y capacidades cognitivas en pacientes con EA. El método de administración para la estrategia consiste en una inyección bilateral, estereotáctica, para dirigirse a la región prosencefálica basal del cerebro que contiene el núcleo basal de Meynert (NBM). Debido a los posibles efectos secundarios resultantes en la necesidad de finalizar el tratamiento, la modificación adicional de la construcción que incluye PITA está garantizada.

La aplicación de PITA en el sistema nervioso central para el tratamiento de epilepsia también puede ser valiosa tanto debido al potencial de realizar la ablación de la expresión génica una vez que se ha resuelto el problema en torno a los ataques así como debido a las estrategias alternativas limitadas disponibles para el tratamiento de epilepsias que no son responsables de terapia con fármacos y dificultan quirúrgicamente el tratamiento. En estos casos, en particular, los métodos de administración que implican inyección estereotáctica de vectores que expresan genes terapéuticos, serían bastante menos invasivos que los tratamientos quirúrgicos alternativos. Los candidatos para la expresión de genes podrían incluir galanina, neuropéptido Y (NPY) y factor neurotrófico derivado de líneas de células gliales, GDNF, que se ha mostrado que tiene efectos terapéuticos en modelos animales de epilepsia. Otras aplicaciones incluyen administrar el factor de crecimiento nervioso (NGF) para que el Alzheimer y L-aminoácido descarboxilasa aromática (ADCC) para la Enfermedad de Parkinson.

15. EJEMPLO 10: PITA PARA TERAPIA DE INFECCIÓN POR VIH

El anticuerpo neutralizante naturalmente inducido contra el VIH se ha identificado en los sueros de pacientes infectados a largo plazo. Como una alternativa a las estrategias de vacunas activas, que han dado como resultado una inducción ineficaz, pero niveles suficientes de anticuerpo neutralizante administrado por VAA, la estrategia de PITA es prometedora para administrar un anticuerpo anti-VIH neutralizante para la inmunoterapia pasiva. Véase la Figura 16. El diseño de la construcción es similar a la administración del gen de avastín para terapia de la AMD (véase las Figuras 12B y 12C). Un vector que comprende una construcción que codifica un anticuerpo regulado por el promotor específico de hígado (TBG) puede inyectarse en el hígado a una dosis de 3×10^{12} CG/kg. Como alternativa, un vector que comprende una construcción que porta un promotor CB7 ubicuo que dirige la expresión del anticuerpo podría administrarse mediante inyección intramuscular a una dosis de 5×10^{12} CG/ml durante hasta 20 inyecciones en el músculo cuádriceps o bíceps. La terapia puede anularse si ya no se requiere o si se desarrolla toxicidad debido a la inducción del anticuerpo antifármaco.

16. EJEMPLO 11:

Las construcciones de ADN descritas en el siguiente ejemplo pueden usarse para preparar virus VAA con replicación defectuosa y composiciones de virus de acuerdo con la invención.

Fases de lectura abierta que codifican diversas endonucleasas se optimizaron por codones y se sintetizaron de nuevo mediante GeneArt. Los plásmidos de expresión del ablacionador y diana se produjeron usando técnicas de clonación de biología molecular convencionales. Las transfecciones se realizaron en células HEK293 usando el reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies). Todas las transfecciones se realizaron usando condiciones de transfección óptimas como se define en el protocolo de reactivos de transfección. En resumen; 200-250 ng de ADN plasmídico (excluyendo plásmido de control de la transfección) formaron complejo con Lipofectamine y se añadieron a células en placas de 96 pocillos. Las cantidades de ADN eran coherentes en todas las condiciones complementando con un plásmido no relacionado que contenía el mismo promotor que los plásmidos de ensayo. Los complejos de transfección se incubaron con células durante 4-6 horas como protocolo de reactivo de transfección antes de la adición de medios complementados con FBS. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C durante 24-72 horas. Después de la incubación, las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador usando el kit de detección Promega Dual Luciferasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un lector de placa BioTek Clarity y se usó luciferasa de *Renilla* para controlar la eficacia de la transfección. Todas las muestras se realizaron por cuadruplicado y se calcularon los errores típicos de la medida.

A. La expresión conjunta de FokI de tipo silvestre ablaciona la expresión del transgén más eficazmente que la administración de la proteína FokI.

La secuencia de aminoácidos de la enzima FokI se proporciona en la SEC ID N°: 12, en la que los aminoácidos 1 a 387 son el dominio de unión al ADN y los aminoácidos 387 a 584 son el dominio catalítico. La secuencia FokI optimizada por codones se proporciona en la SEC ID N°:1.

5 La Figura 18 ilustra que FokI de tipo silvestre es eficaz realizando ablación de la expresión del gen indicador luciferasa después de la transfección conjunta en células HEK293 (Fig. 18A barra 2), mientras que solo se observó ablación parcial cuando se administraba la proteína FokI a las células (Fig. 18A, barra 3).

10 En un experimento dependiente de la dosis, el vector de expresión FokI contenía el dominio catalítico de FokI fusionado a un dominio de unión al ADN de dedo de cinc (ZFHD). Esta construcción, que tiene una longitud de 963 pb, se proporciona en la SEC ID N°: 21 y está compuesta de pares de bases 1 a 366 pb ZFHD, 367 a 372 pb de enlazador y 373 a 963 pb de dominio catalítico FokI. El producto de expresión resultante comprende los aminoácidos 1 a 122 (ZFHD), los aminoácidos 123-124 son un enlazador y los aminoácidos 125 a 321 son del dominio catalítico FokI. La Figura 18B ilustra que aumentando la concentración de FokI se produce una ablación dependiente de la dosis del indicador Luc. No se necesitan sitios de ablación para modificar por ingeniería genética la unidad de transcripción que contiene el transgén en esta ilustración, ya que la luciferasa contiene sitios FokI nativos múltiples.

20 Esto proporciona la confirmación del uso del sistema PITA usando una enzima FokI transfectada dirigida a sitios de ablación específicos en una unidad de transcripción que contiene un transgén para la administración a la célula.

B. El dominio FokI quimérico, modificado por ingeniería genética, unido a un sitio de reconocimiento no afín en el ADN mediante el homeodominio- dedo de cinc, ablaciona de manera eficaz de expresión del gen indicador Luc

25 En este ejemplo, las construcciones plasmídicas contienen el dominio catalítico de FokI (198 aminoácidos (SEC ID N°: 14), que corresponde a los aminoácidos 387 a 584 de la proteína de longitud completa) (FokI no unida) o un dominio catalítico ZFHD-FokI de 963 pb como se describe en la Parte A anterior (FokI unida). Incluso a la concentración más elevada, el dominio catalítico de FokI que no está unido al ADN no tiene efecto sobre la expresión del gen indicador Luc (Fig. 19A). FokI modificado quimérico unido a ADN mediante la fusión con ZFHD realiza la ablación eficaz de la expresión del indicador luciferasa de una manera dependiente de dosis cuando se transfectan conjuntamente concentraciones crecientes del plásmido de expresión ZF-HD-FokI en células HEK293 (Fig. 19B).

30 Esto confirma el uso del sistema PITA y el elemento de seguridad adicional proporcionado por una enzima quimérica dirigida a sitios de ablación específicos en una unidad de transcripción que contiene un transgén para la administración a la célula.

35 C. Especificidad de unión del ADN de FokI quimérico puede cambiarse reproduciblemente mediante la fusión con diversas clases de dominios de unión al ADN heterólogo y la ablación del transgén diana puede mejorarse adicionalmente por la adición de una NLS heteróloga

40 Este ejemplo ilustra que el homeodominio de dedo de cinc (ZFHD) no es solo un dominio adecuado para alterar la especificidad de la ablación mediada por una enzima modificada quimérica. FokI realiza la ablación eficaz de la expresión del indicador luciferasa de una manera dependiente de dosis cuando el dominio de unión a ADN HTH se fusionó al dominio catalítico de FokI (Fig. 20A). En un experimento distinto (Fig. 27B), la actividad de HTH-FokI se mejoró adicionalmente añadiendo una NLS heteróloga en el extremo N de la secuencia que codifica HTH-FokI.

45 El dominio catalítico HTH-FokI (SEC ID N°: 5), está compuesto por 1-171 pb del HTH (dominio hélice-giro-hélice) de Gin (una serina recombinasa), un enlazador (pb 172-177) y un dominio catalítico FokI (178-768 pb) procedente de FokI optimizado por codones. La enzima quimérica resultante (SEC ID N°: 6) contiene 1-57 aa del HTH de Gin, un enlazador (58-59 aa), y un dominio catalítico de FokI (60 - 256 aminoácidos).

50 Las Figuras 20A-20B son diagramas de barras que ilustran que la especificidad de unión del ADN de FokI quimérico puede ser reproducible cambiada por fusión con otra clase de dominios de unión a ADN heterólogos y la ablación del transgén diana puede mejorarse adicionalmente mediante la adición de una señal de localización nuclear heteróloga (NLS). La Figura 20A ilustra los resultados de cotransfección de pCMV. Luciferasa con concentraciones en aumento de un plásmido de expresión que codifica FokI unido al ADN mediante una fusión HTH (6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng). La primera barra es un control que muestra pCMV.Luciferasa 50 ng. La Fig. 20B pCMV.Luciferasa con concentraciones en aumento de un plásmido de expresión que codifica una fusión HTH – FokI, que adicionalmente tiene una NLS en su extremo N.

60 17. EJEMPLO 12:

Aunque no se ilustra en el presente documento, se han fabricado otras enzimas quiméricas usando las técnicas del presente documento:

65

Un plásmido VAA que contiene SV40 T-Ag NLS-hélice-giro-hélice (HTH) de Gin (192 pb, SEC ID N°: 7), que incluye la señal de localización nuclear (1-24 pb) de SV40 T-Ag y HTH de Gin, una serina recombinasa (25 - 192 pb). En la enzima resultante (SEC ID N°: 8), los aminoácidos 1-8 son de SV40 T-Ag NLS y los aminoácidos 9-64 son el HTH de Gin;

Un plásmido VAA que contiene SV40 T-Ag NLS-HTH-Dominio catalítico de FokI (789 pb, SEC ID N°:9), que incluye el SV40 T-Ag NLS (pb 1-24), el HTH de Gin (pb 25-192), un enlazador (pb 193-198) y el dominio catalítico de FokI (pb 199-789). En la enzima quimérica resultante (SEC ID N°: 10), los aminoácidos 1-8 son de SV40 T-Ag NLS, los aminoácidos 9-64 son HTH de Gin, los aminoácidos 65-66 son restos enlazadores, y los aminoácidos 67-263 son el dominio catalítico de FokI.

Se preparó un plásmido VAA que contiene un dominio catalítico SV40 T-Ag NLS-ZFHD-FokI (984 pb) (SEC ID N°: 23), que incluye el SV40 T-Ag NLS (pb 1-24), el homeodominio de dedo de cinc (pb 25 - 387), un enlazador (pb 388-393), y el dominio catalítico de FokI (aminoácidos 394-984). En la enzima quimérica resultante (SEC ID N°: 21, 328 aa), los aminoácidos 1-8 son el SV40 T-Ag NLS, los aminoácidos 9-129 son el ZFHD, los aminoácidos 130-131 son restos enlazadores y los aminoácidos 132-138 son el dominio catalítico FokI.

Estas y otras construcciones pueden usarse para preparar virus de acuerdo con el método de la invención para su uso en una composición de virus y en el sistema de PITA.

18. EJEMPLO 13: Uso de una composición de virus VAA con replicación defectuosa en el tratamiento del VIH

Esta composición podría usarse posiblemente como un mecanismo de seguridad en el tratamiento del VIH. Recientemente, diversos grupos de investigación han identificado anticuerpos ampliamente neutralizantes de individuos que no presentan progresión de la enfermedad a largo plazo, que mantienen un estado VIH+ durante varias décadas sin que la enfermedad progrese a SIDA.

Todas las regiones codificantes del anticuerpo neutralizante contra el VIH (VIH Nab) se colocan entre las repeticiones terminales invertidas (ITR) del VAA. Si el tamaño total de las construcciones está por debajo de 4,7 kb (incluyendo las dos ITR), estas se empaquetan en la cápside del VAA. La cápside de serotipo VAA seleccionada dependerá del nivel de expresión génica, del método de administración y del grado de biodistribución desde el sitio de inyección requerido. Además, los promotores constitutivos usados para la expresión del VIH NAb (y posiblemente las partes del sistema inducible en la situación de una molécula pequeña) dependerían del tipo de tejido diana. En el siguiente ejemplo de un posible estudio clínico el serotipo del vector seleccionado sería un VAA8 administrado por inyección intravenosa que permitiría la utilización del promotor TBG específico de hígado.

En pacientes HIV⁴, la administración de vectores VAA que expresan uno o más de estos anticuerpos VIH neutralizantes, conduciría a un alto nivel de expresión prolongado de uno o más VIH NAb ampliamente y reduciría la carga viral y posiblemente impediría la adquisición del VIH. En esta situación, los individuos recibirían inyección intravenosa de dos vectores VAA a una dosis de 5×10^{12} copias de genoma / kilogramo de cada vector. Contenido dentro de los dos vectores VAA estaría el anticuerpo VIH neutralizante bajo el control de un promotor constitutivo, lo que permite que se produzca la expresión rápidamente después de la administración del vector.

A. Heterodímero y dos moléculas pequeñas

Después de los primeros síntomas de una posible toxicidad contra el VIH Nab, el primer fármaco de molécula pequeña se administraría para inducir la expresión de los componentes del sistema inducible, en este caso el dominio de unión al ADN ligado a FKPB y FRAP_L ligado al dominio catalítico de una enzima endonucleasa. Esto permitiría cebar el sistema para la acción si se desarrollara toxicidad adicional contra el VIH Nab. Si los niveles de toxicidad continúan elevándose entonces el inicio de la actividad endonucleasa se induciría por la administración de un segundo fármaco de molécula pequeña que conduciría a la formación de una enzima activa y la ablación de la expresión del gen VIH Nab.

B. Heterodímero y una molécula pequeña

Además bajo el control de la expresión constitutiva estarían los elementos del sistema inducible por rapamicina, FKPB y FRAP_I. Después de la administración de los vectores VAA, los pacientes se supervisarían estrechamente a intervalos regulares durante varios años. Si la toxicidad contra el VIH Nab se desarrolla entonces se implementaría administración de rapamicina o un rapálogo. La administración IV de 1 mg/kg de rapamicina/ rapálogo en el primer caso con la posibilidad de aumentar la dosificación repetida podría administrarse para realizar la ablación de la expresión del anticuerpo VIH.

La toxicidad y los niveles del anticuerpo VIH podrían controlarse estrechamente hasta que la expresión del VIH Nab hubiese alcanzado niveles no detectables. Por lo tanto, la ablación de la expresión génica del VIH Nab proporcionaría un cambio de seguridad para realizar la ablación de la expresión de genes si se produjera una toxicidad insuperable.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición de virus con replicación defectuosa adecuada para el uso en sujetos humanos en el que el genoma viral se ha diseñado para que contenga: (a) una primera unidad de transcripción que codifica un producto terapéutico en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha unidad al menos un sitio de reconocimiento de ablación; y (b) una segunda unidad de transcripción que codifica un ablacionador específico para al menos un sitio de reconocimiento de ablación en asociación operativa con un promotor, en el que la transcripción y/o actividad de ablación está controlada por un agente farmacológico, por ejemplo, un dimerizador. Por ejemplo, un agente farmacológico adecuado podría ser la rapamicina o un análogo de rapamicina. La composición de virus puede contener dos o más reservas de virus diferentes.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición de virus con replicación defectuosa adecuada para uso en sujetos humanos en el que el genoma viral comprende (a) una primera unidad de transcripción que codifica un producto terapéutico en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha primera unidad de transcripción un sistema de reconocimiento de ablación; y una segunda unidad de transcripción que codifica un ablacionador específico para el sitio de reconocimiento de ablación en asociación operativa con un promotor, en el que la actividad de transcripción y/o ablación está controlada por un agente farmacológico. La primera unidad de transcripción puede contener más de un sitio de reconocimiento de ablación. Cuando el genoma comprende más de un sitio de reconocimiento de ablación, dicho más de un sitio de reconocimiento de ablación comprende un primer sitio de reconocimiento de ablación y un segundo sitio de reconocimiento de ablación que difiere de dicho primer sitio de reconocimiento de ablación, comprendiendo dicho virus adicionalmente un primer ablacionador específico para el primer sitio de reconocimiento de ablación y un segundo ablacionador específico para el segundo sitio de reconocimiento.

En una divulgación la transcripción, bioactividad y/o especificidad de unión del ADN del ablacionador está controlada por un sistema regulable. El sistema regulable puede seleccionarse de un sistema tet activado/desactivado, un sistema tetR-KRAB, un sistema regulable por mifepristona (RU486), un sistema regulable dependiente de tamoxifeno, un sistema regulable por rapamicina o un sistema regulable basado en ecdisoma.

En un aspecto, el ablacionador se selecciona del grupo que consiste en: una endonucleasa, una recombinasa, una meganucleasa o una endonucleasa de dedo de cinc que se une al sitio de reconocimiento de ablación en la primera unidad de transcripción y que extirpa o realiza la ablación del ADN y un ARN de interferencia, una ribozima o un antisentido que realiza la ablación del transcrito de ARN de la primera unidad de transcripción o suprime la traducción del transcrito de ARN de la primera unidad de transcripción. En una realización específica, el ablacionador es Cre y el sitio de reconocimiento de la ablación es loxP, o el ablacionador es FLP y el sitio de reconocimiento de ablación es FRT.

En un aspecto, el ablacionador es una endonucleasa modificada quimérica, en el que la composición de virus comprende (i) una primera secuencia que comprende el dominio de unión al ADN de la endonucleasa fusionado a un dominio de unión para un primer agente farmacológico; y en el que la composición de virus comprende adicionalmente (ii) una segunda secuencia que codifica el dominio de escisión de nucleasa de la endonucleasa fusionado a un dominio de unión para el primer agente farmacológico en el que la primera secuencia (i) y la segunda secuencia (ii) están cada una en asociación operativa con al menos un promotor que controla la expresión de los mismos. La endonucleasa modificada quimérica puede estar contenida dentro de una fase de lectura abierta bicistrónica sencilla en la segunda unidad de transcripción, comprendiendo dicha unidad de transcripción además un enlazador entre (i) y (ii). Opcionalmente, la secuencia (ii) tiene un promotor inducible. En otra realización, los compañeros/fragmentos de fusión de la endonucleasa modificada quimérica están contenidos dentro de fases de lectura abierta distintas. En un aspecto cada una de las primera y segunda secuencia están bajo el control de un promotor constitutivo y el ablacionador está bioactivado por el primer agente farmacológico.

La secuencia codificante para el ablacionador puede comprender adicionalmente una señal de localización nuclear localizada en dirección 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del ablacionador.

En un aspecto, el dominio de unión al ADN se selecciona del grupo que consiste en un dedo de cinc, hélice-giro-hélice, una caja HMG, proteínas Stat, B3, hélice-bucle-hélice, hélice alada-giro-hélice, cremallera de leucina, una hélice alada, dominios POU y un homeodominio.

En otro aspecto adicional, la endonucleasa se selecciona del grupo que consiste en una endonucleasa de restricción de tipo II, una endonucleasa de intrón, y serina o tirosina recombinasas. En un aspecto específico, el ablacionador es una enzima FokI quimérica.

En otra realización adicional, en un virus con replicación defectuosa la composición del genoma viral comprende adicionalmente una tercera y una cuarta unidad de transcripción, codificando cada una de ellas un dominio dimerizable de un factor de transcripción que regula un promotor inducible para el ablacionador, en el que: (c) la tercera unidad de transcripción codifica el dominio de unión al ADN del factor de transcripción fusionado a un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un primer promotor; y (d) la cuarta unidad de transcripción codifica el dominio de activación del factor de transcripción fusionado a un dominio de unión

para el agente farmacológico en asociación operativa con un segundo promotor. El primer promotor de (c) y el segundo promotor de (d) se seleccionan independientemente de un promotor constitutivo y un promotor inducible. En otra divulgación, el primer y el segundo promotores son ambos promotores constitutivos y el agente farmacológico es un dimerizador que dimeriza los dominios del factor de transcripción. En un aspecto adicional, uno del primer promotor y el segundo promotor es un promotor inducible. La tercera y cuarta unidades de transcripción pueden ser una unidad bicistrónica que contenga un IRES o furin-2A.

En una divulgación, el agente farmacológico es rapamicina o un rapálogo.

En una divulgación, el virus es un VAA. Dicho VAA puede seleccionarse entre, por ejemplo, VAA1, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9 y rh10. Incluso otros virus pueden usarse para generar las construcciones de ADN y virus con replicación defectuosa de la invención incluyendo, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes simple y similar.

En una divulgación, el producto terapéutico es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que neutraliza la infectividad de VIH, un receptor 1 de factor de crecimiento endotelial vascular soluble (sFlt-1); Factor VIII, Factor IX, factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), hemo oxigenasa -1 (HO- 1), o factor de crecimiento nervioso (NGF).

En una divulgación de la composición de virus con replicación defectuosa, la primera unidad de transcripción y la segunda unidad de transcripción están en reservas virales diferentes en la composición. Opcionalmente, la primera unidad de transcripción y la segunda unidad de transcripción están en una primera reserva de virus y una segunda reserva de virus comprende un segundo ablacionador o ablacionadores.

En una divulgación, una construcción de ADN recombinante comprende una primera y segunda unidad de transcripción flanqueadas por señales de empaquetamiento de un genoma de virus, en el que: (a) una primera unidad de transcripción que codifica un producto terapéutico está en asociación operativa con un promotor que controla la transcripción, conteniendo dicha primera unidad de transcripción al menos un sitio de reconocimiento de ablación; y (b) una segunda unidad de transcripción que codifica un ablacionador específico para al menos un sitio de reconocimiento de ablación en asociación operativa con un promotor que induce la transcripción en respuesta a un agente farmacológico. Las señales de empaquetamiento que flanquean las unidades de transcripción pueden ser repeticiones terminales invertidas de un VAA 5' (ITR) y ITR de un VAA 3'. Opcionalmente, las ITR de VAA son VAA2, o VAA1, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9 o rh10 ITR. En una realización, la primera unidad de transcripción está flanqueada por las ITR de VAA, y las segunda, tercera y cuartas unidades de transcripción están flanqueadas por ITR de VAA. Opcionalmente, las unidades de transcripción están contenidas en dos o más construcciones de ADN.

En una divulgación, el producto terapéutico es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que neutraliza la infectividad del VIH, el receptor 1 de factor de crecimiento endotelial vascular soluble (sFlt-1); Factor VIII, Factor IX, factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), hemo oxigenasa -1 (HO- 1), o factor de crecimiento nervioso (NGF).

En una divulgación, el promotor que controla la transcripción del producto terapéutico es un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor específico de célula, un promotor inducible o un promotor sensible a síntomas fisiológicos.

Un método se describe para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad en un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento y en el que el producto terapéutico es un antagonista de VEGF.

Se proporciona un método para tratar la hemofilia A en un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento y en el que el producto terapéutico es el Factor VIII.

Se proporciona un método para el tratamiento de la hemofilia B en un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento y en el que el producto terapéutico es el Factor IX.

Se proporciona un método para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento y en el que el producto terapéutico es el factor de crecimiento insulínico o factor de crecimiento de hepatocitos.

Se proporciona un método para el tratamiento de un trastorno en el sistema nervioso en un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento y en el que el producto terapéutico es el factor de crecimiento nervioso.

Se proporciona un método para el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento y en el que el producto terapéutico es un anticuerpo neutralizante contra el VIH.

5 En el presente documento se proporciona un virus con replicación defectuosa para su uso en el control de la administración del producto transgénico. El producto puede seleccionarse del grupo que consiste en un antagonista de VEGF, Factor IX, Factor VIII, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento nervioso y un anticuerpo neutralizante contra el VIH.

10 Se proporciona una célula modificada por ingeniería genética que comprende un virus con replicación defectuosa o una construcción de ADN como se proporciona en el presente documento. La célula modificada por ingeniería genética puede seleccionarse de una célula de planta, bacteriana o una célula de mamífero no humano.

15 Se proporciona un método para determinar cuándo administrar un agente farmacológico para realizar la ablación de un producto terapéutico a un sujeto que recibe un virus con replicación defectuosa como se proporciona en el presente documento que contiene un producto terapéutico y un ablacionador, que comprende: (a) detectar la expresión del producto terapéutico en una muestra de tejido obtenida del paciente, y (b) detectar un efecto secundario asociado con la presencia del producto terapéutico en dicho sujeto, en el que la detección de un efecto secundario asociado con la presencia del producto terapéutico en dicho sujeto indica una necesidad de administrar el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador.

20 Se proporciona un método para determinar cuándo administrar un agente farmacológico para realizar la ablación de un producto terapéutico a un sujeto que recibe la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento que codifica un producto terapéutico y un ablacionador, que comprende: detectar el nivel de un marcador bioquímico de toxicidad asociado con la presencia del producto terapéutico en una muestra de tejido obtenida de dicho sujeto, en el que el nivel de dicho marcador refleja la toxicidad indicando una necesidad de administrar el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador.

25 Estos métodos pueden comprender adicionalmente determinar la presencia de ADN que codifica el producto génico terapéutico, su transcrito de ARN o su proteína codificada en una muestra de tejido del sujeto posterior al tratamiento con el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador, en el que la presencia del ADN que codifica el producto génico terapéutico, es su ARN transcrito o su proteína codificada indica una necesidad de un tratamiento repetido con el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador.

30 La divulgación proporciona adicionalmente un virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento para su uso en el control de la administración de la administración del producto transgénico.

35 En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula modificada por ingeniería genética que comprende un virus con replicación defectuosa o una construcción de ADN como se describe en el presente documento. Dicha célula puede ser una célula de planta, de levadura, de hongo, de insecto, de bacteria, de mamífero no humano o una célula humana.

40 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para determinar cuándo administrar un agente farmacológico para realizar la ablación de un producto terapéutico a un sujeto que ha recibido el virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento que codifica un producto terapéutico y un ablacionador, que comprende: (a) detectar la expresión del producto terapéutico en una muestra de tejido obtenida del paciente, y (b) detectar un efecto secundario asociado con la presencia del producto terapéutico en dicho sujeto, en el que la detección de un efecto secundario asociado con la presencia del producto terapéutico en dicho sujeto indica una necesidad de administrar el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador. En un aspecto adicional más, la divulgación proporciona un método para determinar cuándo administrar un agente farmacológico para realizar la ablación de un producto terapéutico a un sujeto que recibe la composición de virus con replicación defectuosa como se describe en el presente documento que codifica un producto terapéutico y un ablacionador, que comprende: detectar el nivel de un marcador bioquímico de toxicidad asociado con la presencia del producto terapéutico en una muestra de tejido obtenida de dicho sujeto, en el que el nivel de dicho marcador que refleja la toxicidad indica una necesidad de administrar el agente farmacológico que induce la expresión del ablacionador.

Ejemplo 14: Generación de construcciones 10xZF

60 Las fases de lectura abierta que codifican diversas endonucleasas se optimizaron por codones y se sintetizaron de nuevo mediante GeneArt (Invitrogen). La expresión del agente farmacológico y de los plásmidos indicadores diana se produjeron usando técnicas de clonación de biología molecular convencionales. Las transfecciones se realizaron en células HEK293 usando el reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies). Todas las transfecciones se realizaron usando condiciones de transfección óptimas como se define en el protocolo de reactivo de transfección. En resumen, 150-200 ng de ADN plasmídico (excluyendo el plásmido de control de transfección) formó complejo con Lipofectamine y se añadió a células en placas de 96 pocillos. Las cantidades de ADN eran

coherentes en todas las condiciones por complementación con un plásmido no relacionado que contenía el mismo promotor que los plásmidos del ensayo. Los complejos de transfección se incubaron con células durante 4 horas como un protocolo de reactivo de transfección antes de la adición de medios complementados con FBS. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Después de la incubación, las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador usando el kit de detección *Promega Dual Luciferase* de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un lector de placa BioTek Clarity y se usó luciferasa de *Renilla* para controlar la eficiencia de la transfección. Todas las muestras se realizaron por cuadruplicado y se calcularon los errores típicos de la media.

A. Generación del plásmido de expresión 10x ZF

Una vez generada la secuencia 1 al azar y determinada que era direccionable mediante metodologías de diseño de dedo de cinc convencionales, el diseño de las nucleasas se realizó usando los recursos disponibles del The Zinc Finger (ZF) Consortium y la base de datos de dedo de cinc (estos están disponibles para el público. Véase, por ejemplo, bindr.gdcb.iastate.edu:8080/ZiFDB/). Basándose en la degradación de la secuencia de 28-32 pb en sitios de unión 10x 3 pb ZF, se identificaron dominios ZF que se unen a cada una de las secuencias de 3 pb.

Se generaron las siguientes secuencias de 28-32 pb:

[SEC ID N°: 806] GGTCGATGTTTCGCAACGTCGATCGTACGTGCA. Para esta secuencia, hay dos fases de lectura que son direccionables por diferentes dedos de cinc GGT-CGA-TGT-TCG-CAA-CGT-CGA-TCG-TAC-GTG-CA - direccionable G-GTC-GAT-GTT-CGC-AAC-GTC-GAT-CGT-ACG-TGC-A - direccionable (los experimentos descritos en el presente documento se generaron para esta secuencia)

[SEC ID N°: 817]: GGTCGCGACGCGTAATCGTCGATTGGCGTAC. Para esta secuencia, hay dos fases de lectura que son direccionables por dedos de cinc diferentes. G-GTC-GGC-GAC-GCG-TAA-TCG-TCG-ATT-GGC-GTA-C - direccionable GG-TCG-GCG-ACG-CGT-AAT-CGT-CGA-TTG-GCG-TAC - direccionable

[SEC ID N°: 801] GGTCGCGACGCGAATCGTCGATTGGCGTAC. Para esta secuencia, hay dos fases de lectura que son direccionables mediante dedos de cinc diferentes. G-GTC-GGC-GAC-GCG-TAA-TCG-TCG-ATT-GGC-GTA-C - direccionable GG-TCG-GCG-ACG-CGT-AAT-CGT-CGA-TTG-GCG-TAC - direccionable

[SEC ID N°: 802] GGTCGCGACGCGTATCGATTGGCGTAC. Para esta secuencia hay un potencial direccionable mediante un dedo de cinc: GGT-CGG-CGA-CGC-GTA-TCG-ATT-GGC-GTA-C - direccionable

[SEC ID N°: 803] ACTATTCGCACGCCGTACGATAGTCGGCGCGA. Para esta secuencia hay dos fases de lectura direccionables por dedos de cinc ACT-ATT-CGC-ACG-CCG-TAC-GAT-AGT-CGG-CGC-GA - direccionable y A-CTA-TTC-GCA-CGC-CGT-ACG-ATA-GTC-GGC-GCG-A - direccionable.

Para cualquier secuencia de 3 pb para la cual solo una secuencia ZF conocida estaba disponible dentro del consorcio, esta secuencia se seleccionó para la proteína final. Este fue el caso de 3 de los 10 dominios ZF.

Proporcionada dentro de la base de datos del consorcio había una tabla de una combinación previamente ensayada de 2 o 3 ZF unidos entre sí a una orientación particular para unirse al ADN. Dentro de nuestra secuencia aleatoria 1, hay dos regiones que contienen combinaciones previamente ensayadas. Una es un tramo de 3x 3pb y la otra es un tramo de 2x 3pb. Cuando se describió que una combinación previa de ZF funcionaba, esta se incorporó en la secuencia 10x ZF.

Para 3 de las 10 secuencias ZF, solamente la hélice de reconocimiento de la región de unión del ADN se incluyó en el consorcio. Para 7 de las 10 secuencias ZF, la secuencia ZF completa estaba disponible en el consorcio. Por lo tanto, tuvo que generarse la secuencia completa de los ZF en la que solo la hélice de reconocimiento estaba disponible a través del consorcio. Además, para prevenir una homología de secuencia a alto nivel, entre la proteína 10x ZF, la secuencia de proteína conservada del dominio de la proteína ZF se modificó entre una de las dos secuencias conservadas en el consorcio:

secuencia conservada de inicio P PGEKPKYKCECGKSFS-----HQRT [SEC ID N°: 745]
secuencia conservada de inicio T TGEKPFQCRICMRNFS-----HLRTH [SEC ID N°: 807]

Los ZF se ligaron en el extremo N con el extremo C directamente ya que la secuencia de proteína innata permitiría la estructura correcta de la proteína final.

La secuencia 10x ZF se ligó después al dominio catalítico de la enzima FokI (el dominio de unión al ADN se retiró de la secuencia de tipo silvestre) a través de una secuencia enlazadora convencional en el extremo C de la proteína 10x ZF.

En los ejemplos de trabajo a continuación, un ablacionador codificado por la secuencia: secuencia de nucleótidos 10xZF-FokI_Cat': SEC ID N°: 59, se ilustra:

ATGGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCTGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCCAG
 AGAAGAAGCCTGGGCCACCACCAGCGTACGCACCCCGGCGAGAAACCTTAT
 AAGTGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTTCAGCAAGAAGAACGACCTGACCCGG
 CACCAGCGGACACACCCCGGGGAAAAGCCATACAAATGTCCAGAGTGTGGG
 AAGTCTTTCTCCAGCCGGCGGACCTGCAGAGCCCATCAGAGAACACATACCG
 GGGAGAAGCCTTTCCAGTGCCGGATCTGCATGAGAACTTCAGCGTGCGGCA
 CAACCTGACCAGACACCTGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCCTTTCAGTGC
 AGAATCTGTATGCGGAACTTCTCCGACCGGACCAGCCTGGCCCCGGCATCTGA
 GAACTCATCCTGGGGAAAAGCCCTATAAGTGTCCAGAATGCGGGAAATCCTT
 TAGCGACAGCGGCAACCTGCGGGTGACCCAGAGGACTCATCCAGGCGAGAA
 ACCCTACAAATGCCCCGAATGCGGAAAGTCATTCTCCACACCGGCCATCTG
 CTCGAGCATCAGCGGACCCACACTGGGGAGAAACCATTTTCAGTGTGCGATCT
 GTATGAGGAATTTTCAGCACCAACCAGGCCCTGGGCGTGACCTGAGAACAC
 ACCCAGGCGAGAAGCCTTACAAGTGTCCAGAGTGCGGAAAGTCATTTTCCGT
 GCGCCACAATCTGACACGGCATCAGCGCACCCATCCCGGCGAGAAGCCTTAC
 AAATGCCCCGAGTGTGGCAAATCTTTCAGTGACCGGACCTCTCTGGCCAGAC
 ATCAGAGGACACACGGCACTAGTGGCAAGCAGCTGGTGAAAAGCGAGCTGG
 AAGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCACAAGCTGAAATACGTGCCCCACGAGT
 ACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACCCACCCAGGACAGAATCCTGG
 AAATGAAGGTCATGGAATTTTTCATGAAGGTGTACGGCTACCGGGGCGAGCA
 CCTGGGCGGCAGCAGAAAACCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCAGCCC
 CATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCCTACAGCGGCGGCTACAA
 CCTGCCCATCGGACAGGCCGACGAGATGCAGAGATACGTGGAAGAGAACCA
 GACCCGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCAG
 CAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTGTCGGGCCACTTCAAGGGCAAC
 TACAAGGCCAGCTGACCCGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCTG
 TGCTGAGCGTGGAAGAAGTGTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCA
 CCCTGACCCTGGAAGAAGTGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACT
 TCTGATAG.

- 5 En esta construcción, 1-84 pb: el N1 de dedo de cinc (hélice de reconocimiento QRRSLGH, forma P, se une a TGC); pb 85-168: dedo de cinc N2 (hélice de reconocimiento KKNLDR, forma P, se une a ACG); pb 169-252: dedo de cinc N3 (hélice de reconocimiento SRRTCRA, forma P, se une a CGT); pb 253-336: dedo de cinc N4 (hélice de reconocimiento VRHNLTR, forma T, se une a GAT); pb 337-420: dedo de cinc N5 (hélice de reconocimiento DRTSLAR, forma T, se une a GTC); pb 421-504 pb: dedo de cinc N6 (hélice de reconocimiento DSGNLRV, forma P, se une a AAC); pb 505-588: dedo de cinc N7 (hélice de reconocimiento HTGHLLEM, forma P, se une a CGC); pb
- 10

589-672: dedo de cinc N8 (hélice de reconocimiento TNQALGV, forma T, se une a GTT); pb 673-756: dedo de cinc N9 (hélice de reconocimiento VRHNLTR, forma P, se une a GAT); pb 757-840: dedo de cinc N10 (hélice de reconocimiento DRTSLAR, forma P, se une a GTC); pb 841-855 : enlazador de 5 aminoácidos; pb 856-1443: dominio catalítico FokI.

5 El ablacionador ilustrativo transcrito tiene la siguiente secuencia en la que los dedos de cinc impares se indican subrayados para ilustrar la localización de cada uno de los 10 dedos de cinc; los dedos de cinc se separan solamente con un guion para facilitar su identificación: secuencia de aminoácidos 10xZF-FokI_Cat: SEC ID N°: 60:

10 MGEKPYKCPECGKSFSORRSLGHHORTH - PGEKPYK
(N1)

CPECGKSFSKKNLDRHQTH - PGEKPYKCPECGKSFSRRTCRAHORTH
(N2) (N3)

15 TGEKPFQCRICMRNFSVRHNLTRHLRTH - TGEKPFQCRICMRNFSDRTH
(N4)

20 SLARHLRTH - PGEKPYKCPECGKSFS SGNLRVHQTH - PGEKPYKCPECGK
(N5) (N6)

SFSHTGHLLEHORTH - TGEKPFQCRICMRNFSTNQALGVHLRTH - PGEKPYKC
(N7) (N8)

25 PECGKSFSVRHNLDRHORTH - PGEKPYKCPECGKSFSDRTHSLARHQTH
(N9) (N10)

30 GTSGKQLVKSELEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNPTQDRILEMKVMEFFM
KVYGYRGEHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVVDTKAYSGGYNLPQADEMQR
YVEENQTRNKHINPNEWVKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNC NGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT-
LEEVRKFNNGEINF. 1-28 aa - dedo de cinc N1 (hélice de reconocimiento QRRSLGH, forma P, se une a TGC); 29-
56 aa - dedo de cinc N2 (hélice de reconocimiento KKNLDR, forma P, se une a ACG); 57-84 aa - dedo de cinc N3
(hélice de reconocimiento SRRTCRA, forma P, se une a CGT); 85-112 aa - dedo de cinc N4 (hélice de
35 reconocimiento VRHNLTR, forma T, se une a GAT); 113-140 aa - dedo de cinc N5 (hélice de reconocimiento
DRTSLAR, forma T, se une a GTC); 141-168 aa - dedo de cinc N6 (hélice de reconocimiento DSGNLRV, forma P,
se une a AAC); 169-196 aa - dedo de cinc N7 (hélice de reconocimiento HTGHLLEM, forma P, se une a CGC); 197-
224 aa - dedo de cinc N8 (hélice de reconocimiento TNQALGV, forma T, se une a GTT); 225-252 aa - dedo de cinc
N9 (hélice de reconocimiento VRHNLTR, forma P, se une a GAT); 253-280 aa - dedo de cinc N10 (hélice de
40 reconocimiento DRTSLAR, forma P, se une a GTC); 281-284 aa – enlazador de 5 aminoácidos; y 285-481 aa –
dominio catalítico FokI.

45 En otra realización, el ablacionador tiene la secuencia de SEC ID N°: 60, excepto que la secuencia del primer dedo
de cinc (N1) es la construcción anterior (SEC ID N°: 15) está reemplazada por la SEC ID N°: 188, que tiene una P
insertada después del codón de inicio.

50 En otra realización, la secuencia 10x ZF está ligada al dominio catalítico de la enzima FokI (el dominio de unión al
ADN se retiró de la secuencia de tipo silvestre) a través de una secuencia enlazadora en el extremo N de la proteína
10x ZF.

La secuencia de nucleótidos FokI_Cat -10x ZF ligada a N: SEC ID N°: 808:

ATGAAGCAGCTGGTGAAAAGCGAGCTGGAAGAGAAGAAGTCCGAGCTGCGGCA
 CAAGCTGAAATACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAA
 CCCCACCCAGGACAGAATCCTGGAAATGAAGGTCATGGAATTTTTCATGAAGGT
 GTACGGCTACCGGGGCGAGCACCTGGGCGGCAGCAGAAAACCCGACGGCGCCA
 TCTACACCGTGGGCGAGCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCT
 ACAGCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGACAGGCCGACGAGATGCAGAGATAC
 GTGGAAGAGAACCAGACCCGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGA
 GGTGTACCCAGCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTC
 AAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCCGGCTGAACCACATCACCAACTGCAAC
 GGCGCTGTGCTGAGCGTGGAAGAACTGCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCC
 GGCACCCTGACCCTGGAAGAAGTGCGGCGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAA
 CTTCCGCACTAGTGGCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCTGAGTGCGGCAAGAG
 CTTACGCCAGAGAAGAAGCCTGGGCCACCACCAGCGTACGCACCCCGGCGAGA
 AACCTTATAAGTGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTTCAGCAAGAAGAACGACCTGA
 CCCGGCACCAAGCGGACACACCCCGGGGAAAAGCCATACAAATGTCCAGAGTGT
 GGGAAGTCTTTCTCCAGCCGGCGGACCTGCAGAGCCCATCAGAGAACACATACC
 GGGGAGAAGCCTTTCCAGTGCCGGATCTGCATGAGAACTTCAGCGTGCGGCAC
 AACCTGACCAGACACCTGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCCCTTTCAGTGCAGA
 ATCTGTATGCGGAACTTCTCCGACCGGACCAGCCTGGCCCGGCATCTGAGAACT
 CATCCTGGGGAAAAGCCCTATAAGTGTCCAGAATGCGGGAAATCCTTTAGCGAC
 AGCGGCAACCTGCGGGTGCACCAGAGGACTCATCCAGGCGAGAAACCCTACAA
 ATGCCCCGAATGCGGAAAGTCATTCTCCACACCGGCCATCTGCTCGAGCATCA
 GCGGACCCACACTGGGGAGAAACCATTTTCAGTGTGCATCTGTATGAGGAATTT
 CAGCACCAACCAGGCCCTGGGCGTGACCTGAGAACACACCCAGGCGAGAAGC
 CTTACAAGTGTCCAGAGTGCGGAAAGTCATTTTCCGTGCGCCACAATCTGACAC
 GGCATCAGCGCACCCATCCCGGCGAGAAGCCTTACAAATGCCCCGAGTGTGGCA
 AATCTTTCAGTGACCGGACCTCTCTGGCCAGACATCAGAGGACACAC.

- 5 Esta secuencia de ácido nucleico codifica: el dominio catalítico de FokI (1-594 pb), 4 enlazadores de aminoácidos (595-606 pb), el dedo de cinc N1 (hélice de reconocimiento QRRSLGH, forma P, que se une a TGC) (607-687 pb), el dedo de cinc N2 (hélice de reconocimiento KKNDLTR, forma P, que se une a ACG) (688-771 pb), el dedo de cinc N3 (hélice de reconocimiento SRRTCRA, forma P, que se une a CGT) (772-855 pb), el dedo de cinc N4 (hélice de reconocimiento VRHNLTR, forma T, que se une a GAT) (856-939 pb), el dedo de cinc N5 (hélice de reconocimiento DRTSLAR, forma T, que se une a GTC) (940-1023 pb), el dedo de cinc N6 (hélice de reconocimiento DSGNLRV, forma P, que se une a AAC) (1024-1107 pb), el dedo de cinc N7 (hélice de reconocimiento HTGHLEEM, forma P, que se une a CGC) (1108-1191 pb), el dedo de cinc N8 (hélice de reconocimiento TNQALGV, forma T, que se une a GTT) (1192-1275 pb), el dedo de cinc N9 (hélice de reconocimiento VRHNLTR, forma P, que se une a GAT) (1276-1359 pb), el dedo de cinc N10 (hélice de reconocimiento DRTSLAR, forma P, que se une a GTC) (1360-1443 pb).

15

La secuencia de aminoácidos 10xZF-FokI_Cat ligada a N transcrita: SEC ID N°: 809: es la siguiente:

MKQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNPTQDRILEMKVMEFFMKVYGY
 RGEHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQT
 RNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEE
 LLLGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINFGTSGGEKPYKCPECGKSFSQRRSLGHHQ
RTHPGEKPYKCPECGKSFSKKNLDRHQRTHPGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQ
RTHPGEKPYKCPECGKSFSSDSGNLRVHQRTHPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQ
HTGEPKFQCRICMRNFSVRHNLTRHLRTHTGEPKFQCRICMRNFSDRTSLARHLRT
HPGEKPYKCPECGKSFSSDSGNLRVHQRTHPGEKPYKCPECGKSFSVRHNLTRHQ
HTGEPKFQCRICMRNFSTNQALGVHLRTHPGEPKFQCRICMRNFSVRHNLTRHQ
HPGEKPYKCPECGKSFSDRTSLARHQRTH.

Esta endonucleasa quimérica es: Dominio catalítico de FokI (1-198 aa), enlazador de 5 aminoácidos (199-202 aa),
 dedo de zinc N1 (hélice de reconocimiento QRRSLGH, forma P, que se une a TGC) (203-229 aa), dedo de cinc N2
 5 (hélice de reconocimiento KKNLDR, forma P, que se une a ACG) (230-257 aa), dedo de cinc N3 (hélice de
 reconocimiento SRRTCRA, forma P, que se une a CGT) (258-285 aa), dedo de cinc N4 (hélice de reconocimiento
 VRHNLTR, forma T, que se une a GAT) (286-313 aa), dedo de cinc N5 (hélice de reconocimiento DRT- SLAR, forma
 T, que se une a GTC) (314-341 aa), dedo de cinc N6 (hélice de reconocimiento DSGNLRV, forma P, que se une a
 AAC) (342-369 aa), dedo de cinc N7 (hélice de reconocimiento HTGHLLEM, forma P, que se une a CGC) (370-397
 10 aa), dedo de cinc N8 (hélice de reconocimiento TNQALGV, forma T, que se une a GTT) (398-425 aa), dedo de cinc
 N9 (hélice de reconocimiento VRHNLTR, forma P, que se une a GAT) (426-453 aa), y dedo de cinc N10 (hélice de
 reconocimiento DRTSLAR, forma P, que se une a GTC) (454-481 aa).

B. Generación de plásmidos indicadores para la proteína 10x ZF-FokI_Cat

Para estudiar la eficacia del plásmido de expresión 10x ZF, también se diseñó una serie de plásmidos indicadores
 luciferasa con la secuencia única de 32 pb: [SEC ID N°: 806] GGTCGATGTTGCAACGTCGATCGTACGTGCA
 generada como se describe en el aparato A anterior. Estos vectores incluyen:

- 20 pITA-030, que contiene, desde el extremo 5' al 3': un potenciador y un promotor (1-832 pb) temprano inmediato
 (IE, *immediate early*) de citomegalovirus (CMV), un intrón Promega™ (833-1029 pb), la secuencia de 32 pb en
 orientación sentido (1069-1100 pb), un espaciador (1101-1106 pb), la secuencia de 32 pb en orientación invertida
 (1107-1138 pb), una secuencia Kozak (1147-1152 pb), la secuencia codificante para un gen indicador de
 luciferasa (1153-2802 pb), y una secuencia poliA de SV40 (2822-3061 pb), de SEC ID N°: 811.
- 25 pITA-031, que contiene, desde el extremo 5' al 3': un potenciador/promotor (1-832 pb) IE de CMV, un intrón
 Promega™ (833-1029 pb), la secuencia de 32 pb en orientación sentido/directa (1069-1100 pb), un espaciador
 (1101-1106 pb), la secuencia de 32 pb en orientación invertida (1107-1138 pb), una secuencia Kozak (1147-1152
 pb), la secuencia codificante de un gen indicador de luciferasa (1153-2802 pb), una secuencia de 32 pb en
 orientación en sentido (2815-2846 pb), un espaciador (2847-2852 pb), la secuencia de 32 pb en orientación
 30 invertida (2853-2884 pb), y una secuencia poliA de SV40 (2893-3131 pb), de SEC ID N°: 812.
- pITA-032, que contiene, desde el extremo 5' al 3': un potenciador/promotor (1-832 pb) IE de CMV, un intrón
 Promega™ (833-1029 pb), la secuencia de 32 pb en orientación sentido (1069-1100 pb), una secuencia Kozak
 (1115-1120 pb), la secuencia codificante de un gen indicador de luciferasa (1121-2770 pb), y una secuencia
 poliA del SV40 (2791-3029 pb), de SEC ID N°: 813.
- 35 pITA-033, que contiene, desde el extremo 5' al 3': un potenciador/promotor (1-832 pb) IE de CMV, un intrón
 Promega™ (833-1029 pb), la secuencia de 32 pb en orientación sentido (1069-1100 pb), una secuencia Kozak
 (1115-1120 pb), la secuencia codificante de un gen indicador de luciferasa (1121-2770 pb), la secuencia de
 32 pb en orientación sentido (2783-2814 pb), y una secuencia poliA del SV40 (2829-3067 pb), de SEC ID N°:
 814.
- 40 pITA-034, que contiene, desde el extremo 5' al 3': un potenciador/promotor (1-832 pb) IE de CMV, un intrón
 Promega™ (833-1029 pb), la secuencia de 32 pb en orientación sentido (1069-1100 pb), una secuencia Kozak
 (1115-1120 pb), la secuencia codificante de un gen indicador de luciferasa (1121-2770 pb), la secuencia de
 32 pb en orientación directa (2789-2820 pb), y una secuencia poliA del SV40 (2829-3067 pb), de SEC ID N°: 815.
- 45 pITA-005 (control) contiene del extremo 5' al 3': un potenciador/promotor (1-832 pb) IE de CMV, un intrón
 Promega™ (833-1029 pb), una secuencia Kozak (1077-1082 pb), la secuencia codificante de un gen indicador
 de luciferasa (1083-2732 pb), y una secuencia poliA del SV40 (2752-2991 pb).

Estos plásmidos indicadores se estudiaron en estudios dependientes de la dosis de la SEC ID N°: 810.

(A) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng) se cotransfectaron en células 293 con 50 ng de pCMV.32bp-Luciferasa (pITA-032, sitio específico sencillo para la proteína 10xZF en el extremo 5' del gen luciferasa). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(B) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y más largo) se cotransfectaron en células 293 con 50 ng de pCMV.32bp-Luciferasa-32pb (pITA-033, sitio específico único para la proteína 10xZF en el extremo 5' y 3' del gen luciferasa en una orientación de cabeza a cola). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(C) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng) se cotransfectaron en células 293 con 50 ng de pCMV.32pb-Luciferasa-32pb (pITA-034, sitio específico único para la proteína 10xZF en el extremo 5' de luciferasa y un sitio invertido específico único en el extremo 3' del gen luciferasa). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(D) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng) se cotransfectaron con 50 ng de pCMV.32pbEspaciador32pb-Luciferasa (pITA-030, sitio específico combinado único para 10xZF que contiene un sitio de 32 pb con un espaciador que separa un gen idéntico aunque invertido de 32 pb en el extremo 5' del gen luciferasa). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(E) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng) se cotransfectaron con 50 ng de pCMV.32pbEspaciador32pb-Luciferasa-32pb (pITA-031, sitio específico combinado único para 10xZF que contiene un sitio de 32 pb con un espaciador que separa un sitio idéntico pero invertido de 32 pb tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' del gen luciferasa). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(F) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 ng) se cotransfectaron con 50 ng de pCMV. Luciferasa (pITA-005, plásmido de expresión de luciferasa que no contiene sitio específico para 10xZF). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(G) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng) se cotransfectaron con 50 ng de pCMV. Luciferasa (pITA-005, plásmido de expresión de luciferasa que no contiene sitio específico para 10xZF). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

En cada una de las (A) - (E) se observó ablación dependiente de dosis en los cinco plásmidos indicadores, demostrando que el diseño 10x ZF proporcionado por esta invención solo requiere que esté presente una secuencia de 32 pb dentro del indicador y por lo tanto, dentro del vector en las aplicaciones descritas en el presente documento.

Se estudiaron diferentes orientaciones del plásmido indicador en estudios dependientes de la dosis.

(H) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF con el dominio 10xZF en el extremo N de la proteína (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25 y 50 ng) se cotransfectaron en células 293 con 50 ng de pCMV.32pbEspaciador32pbLuciferasa (pITA-030, sitio específico combinado sencillo para 10xZF que contiene un sitio de 32 pb con un espaciador que separa un sitio idéntico pero invertido de 32 pb en el extremo 5' del gen luciferasa). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

(I) Concentraciones en aumento del plásmido de expresión que codifica FokI unido a ADN mediante la fusión 10xZF con el dominio catalítico de FokI en el extremo N de la proteína (1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25 y 50 ng) se cotransfectaron en células 293 con 50 ng de pCMV.32pbEspaciador32pbLuciferasa (pITA-030, sitio específico combinado sencillo para 10xZF que contiene un sitio de 32 pb con un espaciador que separa un sitio idéntico pero invertido de 32 pb en el extremo 5' del gen luciferasa). Las células se ensayaron con respecto a la expresión del gen indicador como se ha descrito anteriormente 48 horas después de la transfección.

Para evaluar el efecto que se dirige a un triplete AAC diferente, un dedo de cinc diferente sustituyó el sexto (N6) dedo de cinc en el plásmido de expresión que codifica FokI unido al ADN mediante la fusión 10xZF, que se preparó como se describe en el Ejemplo 14A del presente documento. Usando la estrategia PCR SOEing, la hélice de reconocimiento alternativa DSGNLRV (SEC ID N°: 64) se insertó en el lugar de la GASALRS (SEC ID N°: 66) en N6 del plásmido de expresión del Ejemplo 14A. Esta construcción de segunda generación se denominó pITA-047 y contenía una ITR en 5', un promotor/potenciador IE CMV, el dominio catalítico de FokI del dedo de cinc, poli A, e ITR 3'. En estudios distintos, los plásmidos indicadores descritos anteriormente (pITA-30, pITA-031, PITA-032, y pITA-005) se cotransfectaron (50 ng de plásmido indicador) en células 293 con concentraciones en aumento del plásmido pITA-047 y se midió la expresión de luciferasa 48 horas después de la transfección. La expresión de luciferasa disminuida demuestra una actividad endonucleasa superior. Estos resultados demuestran que la construcción pITA-

047 con la secuencia dirigida a AAC alterada reduce satisfactoriamente la expresión de luciferasa en comparación con el plásmido de primera generación que contiene los mismos elementos de vector pero con los dominios de dedo de cinc de tipo silvestre.

5 (Listado de secuencias sin texto)

La siguiente información se proporciona para secuencias que contienen texto libre con el identificador <223>.

SEC ID Nº: (contiene texto libre)	Texto libre con <223>
59; enzima FokI modificada	<221> misc_feature <222> (1)..(84) <223> dedo de cinc N1 <221> misc_feature <222> (85)..(168) <223> dedo de cinc N2 <221> misc_feature <222> (169)..(252) <223> dedo de cinc N3 <221> misc_feature <222> (337)..(420) <223> dedo de cinc N5 <221> misc_feature <222> (421)..(504) <223> dedo de cinc N6 <221> misc_feature <222> (505)..(588) <223> dedo de cinc N7 <221> misc_feature <222> (589)..(672) <223> dedo de cinc N8 <221> misc_feature <222> (673)..(756) <223> dedo de cinc N9 <221> misc_feature <222> (757)..(840) <223> dedo de cinc N10 <221> misc_feature <222> (841)..(855) <223> enlazador de 5 aminoácidos <222> (856)..(1443) <223> Dominio catalítico FokI 136
706- 708, 710-715, 718, 760, 761,762, 763, 764, 765, 766, 767 - 774, 776 - 791,793, 794, 795 - 796, 798 - 800	<221> misc_feature <222> (12)..(18) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
709, 716, 775, 792, 797,	<221> misc feature <222> (14)..(20) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
723, 726, 754,	<221> misc feature <222> (19)..(25) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
758	<221> misc_feature <222> (18)..(24) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 559 361 T3

SEC ID Nº: (contiene texto libre)	Texto libre con <223>
717, 719, 720, 721, 722, 724, 725, 727-750, 752, 753, 755, 756, 757, 759, 807	<221> misc_feature <222> (17)..(23) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
808	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(594) <223> Dominio catalítico FokI <220> <221> misc_feature <222> (595)..(606) <223> enlazador de 4 aminoácidos <220> <221> misc feature <222> (607)..(687) <223> dedo de cinc N1 <220> <221> misc feature <222> (688)..(771) <223> dedo de cinc N2 <220> <221> misc feature <222> (772)..(855) <223> dedo de cinc N3 <220> <221> misc_feature <222> (856)..(939) <223> dedo de cinc N4 <220> <221> misc_feature <222> (940)..(1023) <223> dedo de cinc N5 <220> <221> misc feature <222> (1024)..(1107) <223> dedo de cinc N6 <220> <221> misc_feature <222> (1108)..(1191) <223> dedo de cinc N7 <220> <221> misc_feature <222> (1192)..(1275) <223> dedo de cinc N8 <220> <221> misc_feature <222> (1276)..(1359) <223> dedo de cinc N9 <220> <221> misc_feature <222> (1360)..(1443) <223> dedo de cinc N10

SEC ID Nº: (contiene texto libre)	Texto libre con <223>
810	<221> misc_feature <222> (1)..(832) <223> potenciador y promotor I.E.(inmediato tardío, <i>immediate early</i>) del CMV <220> <221> misc feature <222> (833)..(1029) <223> Intrón promega <220> <221> misc_feature <222> (1077)..(1082) <223> Secuencia Kozak <220> <221> misc_feature <222> (1083)..(2732) <223> Luciferasa <220> <221> misc_feature <222> (2752)..(2991) <223> PoliA del SV40
811	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(832) <223> Potenciador y promotor I.E. del CMV <220> <221> misc_feature <222> (833)..(1029) <223> Intrón promega <220> <221> misc feature <222> (1069). .(1100) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (1101)..(1106) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (1107). .(1138) <223> secuencia de 32 pb en orientación invertida <220> <221> misc_feature <222> (1147). .(1152) <223> Secuencia Kozak <220> <221> misc_feature <222> (1153)..(2802) <223> Luciferasa <220> <221> misc_feature <222> (2822)..(3061) <223> PoliA del SV40

SEC ID Nº: (contiene texto libre)	Texto libre con <223>
812	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(832) <223> Potenciador y promotor I.E. del CMV <220> <221> misc_feature <222> (833)..(1029) <223> Intrón promega <220> <221> misc_feature <222> (1069)..(1100) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (1101)..(1106) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (1107)..(1138) <223> secuencia de 32 pb en orientación invertida <220> <221> misc_feature <222> (1147)..(1152) <223> Secuencia Kozak <220> <221> misc_feature <222> (1153)..(2802) <223> Luciferasa <220> <221> misc_feature <222> (2815)..(2846) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (2847)..(2852) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2853)..(2884) <223> secuencia de 32 pb en orientación invertida <220> <221> misc_feature <222> (2893)..(3131) <223> PoliA del SV40
813	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(832) <223> Potenciador y promotor I.E. del CMV <220> <221> misc_feature <222> (833)..(1029) <223> Intrón promega <220> <221> misc feature <222> (1069)..(1100) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (1115)..(1120) <223> Secuencia Kozak

SEC ID Nº: (contiene texto libre)	Texto libre con <223>
814	<220> <221> misc_feature <222> (1121)..(2770) <223> Luciferasa <220> <221> misc_feature <222> (2791)..(3029) <223> PoliA del SV40 <220> <221> misc_feature <222> (1)..(832) <223> Potenciador y promotor I.E. del CMV <220> <221> misc_feature <222> (833)..(1029) <223> Intrón promega <220> <221> misc_feature <222> (1069)..(1100) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (1115)..(1120) <223> Secuencia Kozak <220> <221> misc_feature <222> (1121)..(2770) <223> Luciferasa <220> <221> misc_feature <222> (2783)..(2814) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (2829)..(3067) <223> PoliA del SV40
815	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(832)
	<223> Potenciador y promotor I.E. del CMV <220> <221> misc_feature <222> (833)..(1029) <223> Intrón promega <220> <221> misc_feature <222> (1069)..(1100) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (1115)..(1120) <223> Secuencia Kozak <220> <221> misc_feature <222> (1121)..(2770) <223> Luciferasa <220> <221> misc_feature <222> (2789)..(2820) <223> secuencia de 32 pb en orientación directa <220> <221> misc_feature <222> (2829)..(3067) <223> PoliA del SV40

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y de ejemplos, con el objetivo de aclarar el entendimiento, será fácilmente obvio para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de la presente invención, que pueden realizarse determinados cambios y modificaciones en la misma sin alejarse del espíritu de las reivindicaciones adjuntas.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

10

<120> Sistema de ablación transgénica mediada por un vector de virus adenoasociado inducible

<130> UPN-W5486C1PCT

15

<150> US 13/247.306

<151> 28-09-2011

<160> 818

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 579

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enzima Gin modificada

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(579)

<400> 1

atg ctg atc ggc tac gtg cgg gtg tcc acc aac gac cag aac acc gac	48
Met Leu Ile Gly Tyr Val Arg Val Ser Thr Asn Asp Gln Asn Thr Asp	
1 5 10 15	
ctg cag cgg aac gcc ctg gtc tgc gcc ggc tgc gag cag atc ttc gag	96
Leu Gln Arg Asn Ala Leu Val Cys Ala Gly Cys Glu Gln Ile Phe Glu	
20 25 30	
gac aag ctg agc ggc acc cgg acc gac aga ccc gga ctg aag cgg gcc	144
Asp Lys Leu Ser Gly Thr Arg Thr Asp Arg Pro Gly Leu Lys Arg Ala	
35 40 45	
ctg aag cgg ctg cag aaa ggc gac acc ctg gtg gtc tgg aag ctg gac	192
Leu Lys Arg Leu Gln Lys Gly Asp Thr Leu Val Val Trp Lys Leu Asp	
50 55 60	
cgg ctg ggc aga tcc atg aag cac ctg atc agc ctg gtc gga gag ctg	240
Arg Leu Gly Arg Ser Met Lys His Leu Ile Ser Leu Val Gly Glu Leu	
65 70 75 80	
aga gag cgg ggc atc aac ttc aga agc ctg acc gac agc atc gac acc	288
Arg Glu Arg Gly Ile Asn Phe Arg Ser Leu Thr Asp Ser Ile Asp Thr	
85 90 95	
agc agc cct atg ggc cgg ttc ttc ttc tac gtg atg ggc gcc ctg gcc	336
Ser Ser Pro Met Gly Arg Phe Phe Phe Tyr Val Met Gly Ala Leu Ala	
100 105 110	
gag atg gaa aga gag ctg atc atc gag cgg aca atg gcc gga ctg gcc	384
Glu Met Glu Arg Glu Leu Ile Ile Glu Arg Thr Met Ala Gly Leu Ala	
115 120 125	
gct gcc cgg aac aag ggc aga atc ggc ggc aga ccc cct agg ctg acc	432
Ala Ala Arg Asn Lys Gly Arg Ile Gly Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr	
130 135 140	
aag gcc gag tgg gaa cag gct ggc aga ctg ctg gcc cag gga atc ccc	480
Lys Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro	
145 150 155 160	
cgg aaa cag gtg gcc ctg atc tac gac gtg gcc ctg agc acc ctg tat	528
Arg Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr	
165 170 175	
aag aag cac ccc gcc aag aga gcc cac atc gag aac gac gac cgg atc	576
Lys Lys His Pro Ala Lys Arg Ala His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile	
180 185 190	
aac	579
Asn	

- 5 <210> 2
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Construcción sintética
- <400> 2

Met Leu Ile Gly Tyr Val Arg Val Ser Thr Asn Asp Gln Asn Thr Asp
1 5 10 15

Leu Gln Arg Asn Ala Leu Val Cys Ala Gly Cys Glu Gln Ile Phe Glu
20 25 30

Asp Lys Leu Ser Gly Thr Arg Thr Asp Arg Pro Gly Leu Lys Arg Ala
35 40 45

Leu Lys Arg Leu Gln Lys Gly Asp Thr Leu Val Val Trp Lys Leu Asp
50 55 60

Arg Leu Gly Arg Ser Met Lys His Leu Ile Ser Leu Val Gly Glu Leu
65 70 75 80

Arg Glu Arg Gly Ile Asn Phe Arg Ser Leu Thr Asp Ser Ile Asp Thr
85 90 95

Ser Ser Pro Met Gly Arg Phe Phe Phe Tyr Val Met Gly Ala Leu Ala
100 105 110

Glu Met Glu Arg Glu Leu Ile Ile Glu Arg Thr Met Ala Gly Leu Ala
115 120 125

Ala Ala Arg Asn Lys Gly Arg Ile Gly Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr
130 135 140

Lys Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro
145 150 155 160

Arg Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr
165 170 175

Lys Lys His Pro Ala Lys Arg Ala His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile
180 185 190

Asn

- 5 <210> 3
<211> 171
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Enzima Gin modificada
- 15 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(171)
<400> 3


```

atg ggc aga ccc cct agg ctg acc aag gcc gag tgg gaa cag gct ggc      48
Met Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly
1          5          10          15

aga ctg ctg gcc cag gga atc ccc cgg aaa cag gtg gcc ctg atc tac      96
Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr
          20          25          30

gac gtg gcc ctg agc acc ctg tat aag aag cac ccc gcc aag aga gcc      144
Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys Lys His Pro Ala Lys Arg Ala
          35          40          45

cac atc gag aac gac gac cgg atc aac      171
His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn
          50          55

```

<210> 4
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

```

Met Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly
1          5          10          15

Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr
          20          25          30

Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys Lys His Pro Ala Lys Arg Ala
          35          40          45

His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn
          50          55

```

<210> 5
 <211> 768
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> enzima modificada de Gin y FokI

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(768)

<400> 5

atg ggc aga ccc cct agg ctg acc aag gcc gag tgg gaa cag gct ggc Met Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly 1 5 10 15	48
aga ctg ctg gcc cag gga atc ccc cgg aaa cag gtg gcc ctg atc tac Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr 20 25 30	96
gac gtg gcc ctg agc acc ctg tat aag aag cac ccc gcc aag aga gcc Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys Lys His Pro Ala Lys Arg Ala 35 40 45	144
cac atc gag aac gac gac cgg atc aac ggt acc aag cag ctg gtg aaa His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn Gly Thr Lys Gln Leu Val Lys 50 55 60	192
agc gag ctg gaa gag aag aag tcc gag ctg cgg cac aag ctg aaa tac Ser Glu Leu Glu Glu Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr 65 70 75 80	240
gtg ccc cac gag tac atc gag ctg atc gag atc gcc cgg aac ccc acc Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr 85 90 95	288
cag gac aga atc ctg gaa atg aag gtc atg gaa ttt ttc atg aag gtg Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val 100 105 110	336
tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg ggc ggc agc aga aaa ccc gac ggc Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly 115 120 125	384
gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc atc gac tac ggc gtg atc gtg gac Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp 130 135 140	432
acc aag gcc tac agc ggc ggc tac aac ctg ccc atc gga cag gcc gac	480
Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp 145 150 155 160	
gag atg cag aga tac gtg gaa gag aac cag acc cgg aac aag cac atc Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile 165 170 175	528
aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg tac ccc agc agc gtg acc gag ttc Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe 180 185 190	576
aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac ttc aag ggc aac tac aag gcc cag Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln 195 200 205	624
ctg acc cgg ctg aac cac atc acc aac tgc aac ggc gct gtg ctg agc Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser 210 215 220	672
gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc gag atg atc aag gcc ggc acc ctg Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu 225 230 235 240	720
acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag ttc aac aac ggc gag atc aac ttc Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe 245 250 255	768

<210> 6

<211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 6

```

Met Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly
 1           5           10           15

Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr
      20           25           30

Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys Lys His Pro Ala Lys Arg Ala
      35           40           45

His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn Gly Thr Lys Gln Leu Val Lys
 50           55           60

Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr
65           70           75           80

Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr
      85           90           95

Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val

```

				100						105					110				
Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Glu	His	Leu	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Pro	Asp	Gly				
		115					120					125							
Ala	Ile	Tyr	Thr	Val	Gly	Ser	Pro	Ile	Asp	Tyr	Gly	Val	Ile	Val	Asp				
	130					135					140								
Thr	Lys	Ala	Tyr	Ser	Gly	Gly	Tyr	Asn	Leu	Pro	Ile	Gly	Gln	Ala	Asp				
145					150					155					160				
Glu	Met	Gln	Arg	Tyr	Val	Glu	Glu	Asn	Gln	Thr	Arg	Asn	Lys	His	Ile				
				165				170						175					
Asn	Pro	Asn	Glu	Trp	Trp	Lys	Val	Tyr	Pro	Ser	Ser	Val	Thr	Glu	Phe				
			180					185					190						
Lys	Phe	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	His	Phe	Lys	Gly	Asn	Tyr	Lys	Ala	Gln				
		195					200					205							
Leu	Thr	Arg	Leu	Asn	His	Ile	Thr	Asn	Cys	Asn	Gly	Ala	Val	Leu	Ser				
	210					215					220								
Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Ile	Gly	Gly	Glu	Met	Ile	Lys	Ala	Gly	Thr	Leu				
225					230				235						240				
Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Arg	Arg	Lys	Phe	Asn	Asn	Gly	Glu	Ile	Asn	Phe				
				245					250					255					

<210> 7

<211> 192

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> enzima modificada de SV40 y Gin

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(192)

15 <400> 7

atg ccc aag aag aag aga aag gtg ggc aga ccc cct agg ctg acc aag 48
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys
1 5 10 15

gcc gag tgg gaa cag gct ggc aga ctg ctg gcc cag gga atc ccc cgg 96
Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg
20 25 30

aaa cag gtg gcc ctg atc tac gac gtg gcc ctg agc acc ctg tat aag 144
Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys

35 40 45
aag cac ccc gcc aag aga gcc cac atc gag aac gac gac cgg atc aac 192
Lys His Pro Ala Lys Arg Ala His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn
50 55 60

<210> 8
<211> 64
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys
1 5 10 15

Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg
20 25 30

Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys
35 40 45

Lys His Pro Ala Lys Arg Ala His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn
50 55 60

<210> 9
<211> 789
<212> ADN
<213> _Secuencia artificial

<220>
<223> enzima modificada de SV40, Gin y FokI

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(789)

<400> 9

atg ccc aag aag aag aga aag gtg ggc aga ccc cct agg ctg acc aag	48
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys	
1 5 10 15	
gcc gag tgg gaa cag gct ggc aga ctg ctg gcc cag gga atc ccc cgg	96
Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg	
20 25 30	
aaa cag gtg gcc ctg atc tac gac gtg gcc ctg agc acc ctg tat aag	144
Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys	
35 40 45	
aag cac ccc gcc aag aga gcc cac atc gag aac gac gac cgg atc aac	192
Lys His Pro Ala Lys Arg Ala His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn	
50 55 60	
ggt acc aag cag ctg gtg aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc gag	240
Gly Thr Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Lys Lys Ser Glu	
65 70 75 80	
ctg cgg cac aag ctg aaa tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg atc	288
Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile	
85 90 95	
gag atc gcc cgg aac ccc acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag gtc	336
Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val	
100 105 110	
atg gaa ttt ttc atg aag gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg ggc	384
Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly	
115 120 125	
ggc agc aga aaa ccc gac ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc atc	432
Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile	
130 135 140	
gac tac ggc gtg atc gtg gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac aac	480
Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn	
145 150 155 160	
ctg ccc atc gga cag gcc gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag aac	528
Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn	
165 170 175	
cag acc cgg aac aag cac atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg tac	576
Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr	
180 185 190	
ccc agc agc gtg acc gag ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac ttc	624
Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe	
195 200 205	
aag ggc aac tac aag gcc cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc aac	672
Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn	
210 215 220	
tgc aac ggc gct gtg ctg agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc gag	720
Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Ile Gly Gly Glu	
225 230 235 240	
atg atc aag gcc ggc acc ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag ttc	768
Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe	
245 250 255	
aac aac ggc gag atc aac ttc	789
Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe	
260	

<210> 10

<211> 263

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 10

```

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Arg Pro Pro Arg Leu Thr Lys
1          5          10          15

Ala Glu Trp Glu Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Gly Ile Pro Arg
          20          25          30

Lys Gln Val Ala Leu Ile Tyr Asp Val Ala Leu Ser Thr Leu Tyr Lys
          35          40          45

Lys His Pro Ala Lys Arg Ala His Ile Glu Asn Asp Asp Arg Ile Asn
          50          55          60

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

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile
          85          90          95

Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val
          100          105          110

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly
          115          120          125

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile
          130          135          140

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn
145          150          155          160

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn
          165          170          175

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr
          180          185          190

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe
          195          200          205

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn
          210          215          220

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu
225          230          235          240

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe
          245          250          255

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe
          260

```


<210> 11
 <211> 1752
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Enzima FokI modificada

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1752)

<400> 11

atg ttt ctg agc atg gtg tcc aag atc cgg acc ttc ggc tgg gtg cag	48
Met Phe Leu Ser Met Val Ser Lys Ile Arg Thr Phe Gly Trp Val Gln	
1 5 10 15	
aac ccc ggc aag ttc gag aac ctg aag cgg gtg gtg cag gtg ttc gac	96
Asn Pro Gly Lys Phe Glu Asn Leu Lys Arg Val Val Gln Val Phe Asp	
20 25 30	
cgg aac agc aag gtg cac aac gaa gtg aag aac atc aag atc ccc aca	144
Arg Asn Ser Lys Val His Asn Glu Val Lys Asn Ile Lys Ile Pro Thr	
35 40 45	
ctg gtg aaa gag agc aag atc cag aaa gaa ctc gtc gcc atc atg aac	192
Leu Val Lys Glu Ser Lys Ile Gln Lys Glu Leu Val Ala Ile Met Asn	
50 55 60	
cag cac gac ctg atc tac acc tac aaa gaa ctg gtc gga acc ggc acc	240
Gln His Asp Leu Ile Tyr Thr Tyr Lys Glu Leu Val Gly Thr Gly Thr	
65 70 75 80	
agc atc aga agc gag gcc ccc tgc gac gcc atc att cag gcc aca atc	288
Ser Ile Arg Ser Glu Ala Pro Cys Asp Ala Ile Ile Gln Ala Thr Ile	
85 90 95	
gcc gac cag ggc aac aag aag ggc tac atc gac aac tgg tcc agc gac	336
Ala Asp Gln Gly Asn Lys Lys Gly Tyr Ile Asp Asn Trp Ser Ser Asp	
100 105 110	
ggc ttc ctg aga tgg gcc cac gcc ctg ggc ttc atc gag tac atc aac	384
Gly Phe Leu Arg Trp Ala His Ala Leu Gly Phe Ile Glu Tyr Ile Asn	
115 120 125	
aag agc gac agc ttc gtg atc acc gac gtg ggc ctg gcc tac agc aag	432
Lys Ser Asp Ser Phe Val Ile Thr Asp Val Gly Leu Ala Tyr Ser Lys	
130 135 140	
agc gcc gat ggc agc gcc att gag aaa gag atc ctg atc gag gcc atc	480
Ser Ala Asp Gly Ser Ala Ile Glu Lys Glu Ile Leu Ile Glu Ala Ile	
145 150 155 160	
agc agc tac ccc cct gcc atc aga atc ctg acc ctg ctg gaa gat ggc	528
Ser Ser Tyr Pro Pro Ala Ile Arg Ile Leu Thr Leu Leu Glu Asp Gly	
165 170 175	

15

cag cac ctg acc aag ttc gac ctg ggc aag aac ctg ggc ttc tcc ggc Gln His Leu Thr Lys Phe Asp Leu Gly Lys Asn Leu Gly Phe Ser Gly 180 185 190	576
gag agc ggc ttc acc agc ctg ccc gag gga atc ctg ctg gac acc ctg Glu Ser Gly Phe Thr Ser Leu Pro Glu Gly Ile Leu Leu Asp Thr Leu 195 200 205	624
gcc aac gcc atg ccc aag gac aag ggc gag atc cgg aac aac tgg gag Ala Asn Ala Met Pro Lys Asp Lys Gly Glu Ile Arg Asn Asn Trp Glu 210 215 220	672
ggc agc agc gat aag tac gcc aga atg atc ggc ggc tgg ctg gac aag Gly Ser Ser Asp Lys Tyr Ala Arg Met Ile Gly Gly Trp Leu Asp Lys 225 230 235 240	720
ctg ggc ctg gtc aaa cag ggg aag aaa gag ttc atc att ccc acc ctg Leu Gly Leu Val Lys Gln Gly Lys Lys Glu Phe Ile Ile Pro Thr Leu 245 250 255	768
ggc aag ccc gac aac aaa gag ttt atc agc cac gcc ttc aag atc aca Gly Lys Pro Asp Asn Lys Glu Phe Ile Ser His Ala Phe Lys Ile Thr 260 265 270	816
ggc gag ggc ctg aag gtg ctg cgg aga gcc aag ggc agc acc aag ttc Gly Glu Gly Leu Lys Val Leu Arg Arg Ala Lys Gly Ser Thr Lys Phe 275 280 285	864
aca cgg gtg ccc aag cgg gtg tac tgg gag atg ctg gcc acc aac ctg Thr Arg Val Pro Lys Arg Val Tyr Trp Glu Met Leu Ala Thr Asn Leu 290 295 300	912
acc gac aaa gaa tac gtg cgg acc aga cgg gcc ctg atc ctg gaa atc Thr Asp Lys Glu Tyr Val Arg Thr Arg Arg Ala Leu Ile Leu Glu Ile 305 310 315 320	960
ctg att aag gcc ggc agc ctg aag atc gag cag atc cag gac aac ctg Leu Ile Lys Ala Gly Ser Leu Lys Ile Glu Gln Ile Gln Asp Asn Leu 325 330 335	1008
aag aag ctg ggc ttt gac gaa gtg atc gag aca atc gag aac gac atc Lys Lys Leu Gly Phe Asp Glu Val Ile Glu Thr Ile Glu Asn Asp Ile 340 345 350	1056
aag ggc ctg atc aac acc ggc atc ttc atc gag atc aag ggc cgg ttc Lys Gly Leu Ile Asn Thr Gly Ile Phe Ile Glu Ile Lys Gly Arg Phe 355 360 365	1104
tac cag ctg aag gac cac att ctg cag ttc gtg atc ccc aac cgg gga Tyr Gln Leu Lys Asp His Ile Leu Gln Phe Val Ile Pro Asn Arg Gly 370 375 380	1152
gtg ggt acc aag cag ctg gtg aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc Val Gly Thr Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser 385 390 395 400	1200
gag ctg cgg cac aag ctg aaa tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu 405 410 415	1248
atc gag atc gcc cgg aac ccc acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys 420 425 430	1296

gtc atg gaa ttt ttc atg aag gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg 1344
Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu
435 440 445

ggc ggc agc aga aaa ccc gac ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc 1392
Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro
450 455 460

atc gac tac ggc gtg atc gtg gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac 1440
Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr
465 470 475 480

aac ctg ccc atc gga cag gcc gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag 1488
Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu
485 490 495

aac cag acc cgg aac aag cac atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg 1536
Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val
500 505 510

tac ccc agc agc gtg acc gag ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac 1584
Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His
515 520 525

ttc aag ggc aac tac aag gcc cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc 1632
Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr
530 535 540

aac tgc aac ggc gct gtg ctg agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc 1680
Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly
545 550 555 560

gag atg atc aag gcc ggc acc ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag 1728
Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys
565 570 575

ttc aac aac ggc gag atc aac ttc 1752
Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe
580

<210> 12
<211> 584
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética

<400> 12

Met Phe Leu Ser Met Val Ser Lys Ile Arg Thr Phe Gly Trp Val Gln
1 5 10 15

Asn Pro Gly Lys Phe Glu Asn Leu Lys Arg Val Val Gln Val Phe Asp
20 25 30

Arg Asn Ser Lys Val His Asn Glu Val Lys Asn Ile Lys Ile Pro Thr
35 40 45

Leu Val Lys Glu Ser Lys Ile Gln Lys Glu Leu Val Ala Ile Met Asn
 50 55 60

Gln His Asp Leu Ile Tyr Thr Tyr Lys Glu Leu Val Gly Thr Gly Thr
 65 70 75 80

Ser Ile Arg Ser Glu Ala Pro Cys Asp Ala Ile Ile Gln Ala Thr Ile
 85 90 95

Ala Asp Gln Gly Asn Lys Lys Gly Tyr Ile Asp Asn Trp Ser Ser Asp
 100 105 110

Gly Phe Leu Arg Trp Ala His Ala Leu Gly Phe Ile Glu Tyr Ile Asn
 115 120 125

Lys Ser Asp Ser Phe Val Ile Thr Asp Val Gly Leu Ala Tyr Ser Lys
 130 135 140

Ser Ala Asp Gly Ser Ala Ile Glu Lys Glu Ile Leu Ile Glu Ala Ile
 145 150 155 160

Ser Ser Tyr Pro Pro Ala Ile Arg Ile Leu Thr Leu Leu Glu Asp Gly
 165 170 175

Gln His Leu Thr Lys Phe Asp Leu Gly Lys Asn Leu Gly Phe Ser Gly
 180 185 190

Glu Ser Gly Phe Thr Ser Leu Pro Glu Gly Ile Leu Leu Asp Thr Leu
 195 200 205

Ala Asn Ala Met Pro Lys Asp Lys Gly Glu Ile Arg Asn Asn Trp Glu
 210 215 220

Gly Ser Ser Asp Lys Tyr Ala Arg Met Ile Gly Gly Trp Leu Asp Lys
 225 230 235 240

Leu Gly Leu Val Lys Gln Gly Lys Lys Glu Phe Ile Ile Pro Thr Leu
 245 250 255

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

Gly Glu Gly Leu Lys Val Leu Arg Arg Ala Lys Gly Ser Thr Lys Phe
 275 280 285

Thr Arg Val Pro Lys Arg Val Tyr Trp Glu Met Leu Ala Thr Asn Leu
 290 295 300

Thr Asp Lys Glu Tyr Val Arg Thr Arg Arg Ala Leu Ile Leu Glu Ile
 305 310 315 320
 Leu Ile Lys Ala Gly Ser Leu Lys Ile Glu Gln Ile Gln Asp Asn Leu
 325 330 335
 Lys Lys Leu Gly Phe Asp Glu Val Ile Glu Thr Ile Glu Asn Asp Ile
 340 345 350
 Lys Gly Leu Ile Asn Thr Gly Ile Phe Ile Glu Ile Lys Gly Arg Phe
 355 360 365
 Tyr Gln Leu Lys Asp His Ile Leu Gln Phe Val Ile Pro Asn Arg Gly
 370 375 380
 Val Gly Thr Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser
 385 390 395 400
 Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu
 405 410 415
 Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys
 420 425 430
 Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu
 435 440 445
 Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro
 450 455 460
 Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr
 465 470 475 480
 Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu
 485 490 495
 Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val
 500 505 510
 Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His
 515 520 525
 Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr
 530 535 540
 Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly

ES 2 559 361 T3

545 550 555 560
 Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys
 565 570 575
 Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe
 580

5 <210> 13
 <211> 594
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Enzima FokI modificada

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(594)

 15 <400> 13

atg aag cag ctg gtg aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc gag ctg	48
Met Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu	
1 5 10 15	
cgg cac aag ctg aaa tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg atc gag	96
Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu	
20 25 30	
atc gcc cgg aac ccc acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag gtc atg	144
Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met	
35 40 45	
gaa ttt ttc atg aag gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg ggc ggc	192
Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly Gly	
50 55 60	
agc aga aaa ccc gac ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc atc gac	240
Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp	
65 70 75 80	
tac ggc gtg atc gtg gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac aac ctg	288
Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu	
85 90 95	
ccc atc gga cag gcc gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag aac cag	336
Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln	
100 105 110	
acc cgg aac aag cac atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg tac ccc	384
Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro	
115 120 125	
agc agc gtg acc gag ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac ttc aag	432
Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys	
130 135 140	
ggc aac tac aag gcc cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc aac tgc	480
Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys	
145 150 155 160	
aac ggc gct gtg ctg agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc gag atg	528
Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met	
165 170 175	
atc aag gcc ggc acc ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag ttc aac	576
Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn	
180 185 190	
aac ggc gag atc aac ttc	594
Asn Gly Glu Ile Asn Phe	
195	

<210> 14
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 14

Met Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu
 1 5 10 15

Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu
 20 25 30

Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met
 35 40 45

Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly Gly
 50 55 60

Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp
 65 70 75 80

Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu
 85 90 95

Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln
 100 105 110

Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro
 115 120 125

Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys
 130 135 140

Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys
 145 150 155 160

Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met
 165 170 175

Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn
 180 185 190

Asn Gly Glu Ile Asn Phe
 195

<210> 15
 <211> 615
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> enzima modificada de SV40 y FokI

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(615)
 <400> 15

atg ccc aag aag aag aga aag gtg aag cag ctg gtg aaa agc gag ctg	48
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu	
1 5 10 15	
gaa gag aag aag tcc gag ctg cgg cac aag ctg aaa tac gtg ccc cac	96
Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His	
20 25 30	
gag tac atc gag ctg atc gag atc gcc cgg aac ccc acc cag gac aga	144
Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg	
35 40 45	
atc ctg gaa atg aag gtc atg gaa ttt ttc atg aag gtg tac ggc tac	192
Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr	
50 55 60	
cgg ggc gag cac ctg ggc ggc agc aga aaa ccc gac ggc gcc atc tac	240
Arg Gly Glu His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr	
65 70 75 80	
acc gtg ggc agc ccc atc gac tac ggc gtg atc gtg gac acc aag gcc	288
Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala	
85 90 95	
tac agc ggc ggc tac aac ctg ccc atc gga cag gcc gac gag atg cag	336
Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln	
100 105 110	
aga tac gtg gaa gag aac cag acc cgg aac aag cac atc aac ccc aac	384
Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn	
115 120 125	
gag tgg tgg aag gtg tac ccc agc agc gtg acc gag ttc aag ttc ctg	432
Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu	
130 135 140	
ttc gtg tcc ggc cac ttc aag ggc aac tac aag gcc cag ctg acc cgg	480
Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg	
145 150 155 160	
ctg aac cac atc acc aac tgc aac ggc gct gtg ctg agc gtg gaa gaa	528
Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu	
165 170 175	
ctg ctg atc ggc ggc gag atg atc aag gcc ggc acc ctg acc ctg gaa	576
Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu	
180 185 190	
gaa gtg cgg cgg aag ttc aac aac ggc gag atc aac ttc	615
Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe	
195 200 205	

<210> 16

<211> 205

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 16

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu
1 5 10 15

Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His
20 25 30

Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg
35 40 45

Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Glu His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr
65 70 75 80

Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala
85 90 95

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

Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn
115 120 125

Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu
130 135 140

Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg
145 150 155 160

Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu
165 170 175

Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu
180 185 190

Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe
195 200 205

<210> 17
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enzima ZFHD modificada

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(366)

<400> 17

atg gag aga ccc tac gcc tgc ccc gtg gag agc tgc gac aga aga ttc	48
Met Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe	
1 5 10 15	
agc aga agc gac gag ctg acc aga cac atc aga atc cac acc ggc cag	96
Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln	
20 25 30	
aag ccc ttc cag tgc aga atc tgc atg aga aac ttc agc aga agc gac	144
Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp	
35 40 45	
cac ctg acc acc cac atc aga acc cac aca ggc ggc ggc aga aga aga	192
His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg	
50 55 60	
aag aag aga acc agc atc gag acc aac atc aga gtg gcc ctg gag aaa	240
Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys	
65 70 75 80	
agc ttc ctg gag aac cag aag ccc acc agc gag gag atc acc atg atc	288
Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile	
85 90 95	
gcc gac cag ctg aac atg gag aag gag gtg atc aga gtg tgg ttc tgc	336
Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys	
100 105 110	
aac aga aga cag aag gag aag aga atc aac	366
Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn	
115 120	

<210> 18
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 18

ES 2 559 361 T3

Met Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln
 20 25 30

Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp
 35 40 45

His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg
 50 55 60

Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys
 65 70 75 80

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

Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys
 100 105 110

Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn
 115 120

<210> 19

<211> 387

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> enzima modificada de SV40 y ZFHD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<400> 19

atg ccc aag aag aag aga aag gtg gag aga ccc tac gcc tgc ccc gtg 48
 Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val
 1 5 10 15

gag agc tgc gac aga aga ttc agc aga agc gac gag ctg acc aga cac 96
 Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His

ES 2 559 361 T3

	20	25	30	
	atc aga atc cac acc ggc cag aag ccc ttc cag tgc aga atc tgc atg			144
	Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met			
	35	40	45	
	aga aac ttc agc aga agc gac cac ctg acc acc cac atc aga acc cac			192
	Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His			
	50	55	60	
	aca ggc ggc ggc aga aga aga aag aag aga acc agc atc gag acc aac			240
	Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn			
	65	70	75	80
	atc aga gtg gcc ctg gag aaa agc ttc ctg gag aac cag aag ccc acc			288
	Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr			
	85	90	95	
	agc gag gag atc acc atg atc gcc gac cag ctg aac atg gag aag gag			336
	Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu			
	100	105	110	
	gtg atc aga gtg tgg ttc tgc aac aga aga cag aag gag aag aga atc			384
	Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile			
	115	120	125	
	aac			387
	Asn			

<210> 20
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 20

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val
1 5 10 15

Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His
20 25 30

Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
35 40 45

Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His
50 55 60

Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn
65 70 75 80

Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr
85 90 95

Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu
100 105 110

Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile
115 120 125

Asn

<210> 21

<211> 963

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> enzima modificada de ZFHD y FokI

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(963)

<400> 21

atg gag aga ccc tac gcc tgc ccc gtg gag agc tgc gac aga aga ttc	48
Met Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe	
1 5 10 15	
agc aga agc gac gag ctg acc aga cac atc aga atc cac acc ggc cag	96
Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln	
20 25 30	
aag ccc ttc cag tgc aga atc tgc atg aga aac ttc agc aga agc gac	144
Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp	
35 40 45	
cac ctg acc acc cac atc aga acc cac aca ggc ggc ggc aga aga aga	192
His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg	
50 55 60	
aag aag aga acc agc atc gag acc aac atc aga gtg gcc ctg gag aaa	240
Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys	
65 70 75 80	
agc ttc ctg gag aac cag aag ccc acc agc gag gag atc acc atg atc	288
Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile	
85 90 95	
gcc gac cag ctg aac atg gag aag gag gtg atc aga gtg tgg ttc tgc	336
Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys	
100 105 110	
aac aga aga cag aag gag aag aga atc aac ggt acc aag cag ctg gtg	384
Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn Gly Thr Lys Gln Leu Val	
115 120 125	
aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc gag ctg cgg cac aag ctg aaa	432
Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys	
130 135 140	

tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg atc gag atc gcc cgg aac ccc	480
Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro	
145 150 155 160	
acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag gtc atg gaa ttt ttc atg aag	528
Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys	
165 170 175	
gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg ggc ggc agc aga aaa ccc gac	576
Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp	
180 185 190	
ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc atc gac tac ggc gtg atc gtg	624
Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val	
195 200 205	
gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac aac ctg ccc atc gga cag gcc	672
Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala	
210 215 220	
gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag aac cag acc cgg aac aag cac	720
Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His	
225 230 235 240	
atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg tac ccc agc agc gtg acc gag	768
Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu	
245 250 255	
ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac ttc aag ggc aac tac aag gcc	816
Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala	
260 265 270	
cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc aac tgc aac ggc gct gtg ctg	864
Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu	
275 280 285	
agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc gag atg atc aag gcc ggc acc	912
Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr	
290 295 300	
ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag ttc aac aac ggc gag atc aac	960
Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn	
305 310 315 320	
ttc	963
Phe	

<210> 22

<211> 321

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 22

Met	Glu	Arg	Pro	Tyr	Ala	Cys	Pro	Val	Glu	Ser	Cys	Asp	Arg	Arg	Phe
1				5				10					15		

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

Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu
275 280 285

Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr
290 295 300

Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn
305 310 315 320

Phe

<210> 23

<211> 984

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> enzima modificada de SV40, ZFHD y FokI

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(984)

<400> 23

atg ccc aag aag aag aga aag gtg gag aga ccc tac gcc tgc ccc gtg	48
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val	
1 5 10 15	
 gag agc tgc gac aga aga ttc agc aga agc gac gag ctg acc aga cac	96
Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His	
20 25 30	
 atc aga atc cac acc ggc cag aag ccc ttc cag tgc aga atc tgc atg	144
Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met	
35 40 45	
 aga aac ttc agc aga agc gac cac ctg acc acc cac atc aga acc cac	192
Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His	
50 55 60	
 aca ggc ggc ggc aga aga aga aag aag aga acc agc atc gag acc aac	240
Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn	
65 70 75 80	
 atc aga gtg gcc ctg gag aaa agc ttc ctg gag aac cag aag ccc acc	288
Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr	
85 90 95	
 agc gag gag atc acc atg atc gcc gac cag ctg aac atg gag aag gag	336
Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu	
100 105 110	
 gtg atc aga gtg tgg ttc tgc aac aga aga cag aag gag aag aga atc	384
Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile	
115 120 125	

aac ggt acc aag cag ctg gtg aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc	432
Asn Gly Thr Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser	
130 135 140	
gag ctg cgg cac aag ctg aaa tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg	480
Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu	
145 150 155 160	
atc gag atc gcc cgg aac ccc acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag	528
Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys	
165 170 175	
gtc atg gaa ttt ttc atg aag gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg	576
Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu	
180 185 190	
ggc ggc agc aga aaa ccc gac ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc	624
Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro	
195 200 205	
atc gac tac ggc gtg atc gtg gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac	672
Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr	
210 215 220	
aac ctg ccc atc gga cag gcc gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag	720
Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu	
225 230 235 240	
aac cag acc cgg aac aag cac atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg	768
Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val	
245 250 255	
tac ccc agc agc gtg acc gag ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac	816
Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His	
260 265 270	
ttc aag ggc aac tac aag gcc cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc	864
Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr	
275 280 285	
aac tgc aac ggc gct gtg ctg agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc	912
Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly	
290 295 300	
gag atg atc aag gcc ggc acc ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag	960
Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys	
305 310 315 320	
ttc aac aac ggc gag atc aac ttc	984
Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe	
325	

<210> 24

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 24

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

Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His
260 265 270

Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr
275 280 285

Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly
290 295 300

Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys
305 310 315 320

Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe
325

<210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 25
tagggataac agggtaat 18

<210> 26
<211> 168
<212> ADN
<213> virus 2 adenoasociado

<400> 26

ctgcgcgctc gctcgcctac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccg ccatgctact tatctacg 168

<210> 27
<211> 832
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> citomegalovirus

<400> 27

taggaagatc ttcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc 60
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata ataatatgta catttatatt 120
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttgg cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 180
tcaattacgg ggtcattagt tcatagocca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 240
gtaaatggcc cgcttggtg accgccaac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg 300

tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 360
cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gcccctatt 420
gacgtcaatg acggtaaattg gccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac 480
tttctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt 540
tggcagtaca ccaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac 600
cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 660
cgtaataacc ccgcccgtt gacgcaaattg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggttat 720
ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcactagaa gctttattgc ggtagtttat 780
cacagttaaa ttgctaacgc agtcagtgt tctgacacaa cagtctcgaa ct 832

<210> 28
<211> 173
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> citomegalovirus

<400> 28

actcacgggg atttccaagt ctccacocca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 60
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta ataacccgc cccgttgacg caaatgggag 120
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgt 173

<210> 29
<211> 900
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción modificada de c-Myc NLS, FRAP y *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(900)

<400> 29

ES 2 559 361 T3

atg gac tat cct gct gcc aag agg gtc aag ttg gac tct aga atc ctc	48
Met Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Arg Ile Leu	
1 5 10 15	
tgg cat gag atg tgg cat gaa ggc ctg gaa gag gca tct cgt ttg tac	96
Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr	
20 25 30	
ttt ggg gaa agg aac gtg aaa ggc atg ttt gag gtg ctg gag ccc ttg	144
Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu	
35 40 45	
cat gct atg atg gaa cgg ggc ccc cag act ctg aag gaa aca tcc ttt	192
His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe	

50	55	60	
aat cag gcc tat ggt cga gat tta atg gag gcc caa gag tgg tgc agg			240
Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg			
65	70	75	80
aag tac atg aaa tca ggg aat gtc aag gac ctc ctc caa gcc tgg gac			288
Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp			
	85	90	95
ctc tat tat cat gtg ttc cga cga atc tca aag act aga gat gag ttt			336
Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Arg Asp Glu Phe			
	100	105	110
ccc acc atg gtg ttt cct tct ggg cag atc agc cag gcc tcg gcc ttg			384
Pro Thr Met Val Phe Pro Ser Gly Gln Ile Ser Gln Ala Ser Ala Leu			
	115	120	125
gcc cag gcc cct ccc caa gtc ctg ccc cag gct cca gcc cct gcc cct			432
Ala Pro Ala Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ala Pro			
	130	135	140
gct cca gcc atg gta tca gct ctg gcc cag gcc cca gcc cct gtc cca			480
Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ala Pro Val Pro			
	145	150	155
gtc cta gcc cca ggc cct cct cag gct gtg gcc cca cct gcc ccc aag			528
Val Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gln Ala Val Ala Pro Pro Ala Pro Lys			
	165	170	175
ccc acc cag gct ggg gaa gga acg ctg tca gag gcc ctg ctg cag ctg			576
Pro Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu Gln Leu			
	180	185	190
cag ttt gat gat gaa gac ctg ggg gcc ttg ctt ggc aac agc aca gac			624
Gln Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Thr Asp			
	195	200	205
cca gct gtg ttc aca gac ctg gca tcc gtc gac aac tcc gag ttt cag			672
Pro Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu Phe Gln			
	210	215	220
cag ctg ctg aac cag ggc ata cct gtg gcc ccc cac aca act gag ccc			720
Gln Leu Leu Asn Gln Gly Ile Pro Val Ala Pro His Thr Thr Glu Pro			
	225	230	235
atg ctg atg gag tac cct gag gct ata act cgc cta gtg aca ggg gcc			768
Met Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr Gly Ala			
	245	250	255
cag agg ccc ccc gac cca gct cct gct cca ctg ggg gcc ccg ggg ctc			816
Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro Gly Leu			
	260	265	270
ccc aat ggc ctc ctt tca gga gat gaa gac ttc tcc tcc att gcg gac			864
Pro Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala Asp			
	275	280	285
atg gac ttc tca gcc ctg ctg agt cag atc agc tcc			900
Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser			
	290	295	300

<210> 30

<211> 300

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

5

```

Met Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Arg Ile Leu
1          5          10          15

Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr
          20          25          30

Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu
          35          40          45

His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe
          50          55          60

Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg
65          70          75          80

Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp
          85          90          95

Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Arg Asp Glu Phe
          100          105          110

Pro Thr Met Val Phe Pro Ser Gly Gln Ile Ser Gln Ala Ser Ala Leu
          115          120          125

Ala Pro Ala Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ala Pro
          130          135          140

Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ala Pro Val Pro
145          150          155          160

Val Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gln Ala Val Ala Pro Pro Ala Pro Lys
          165          170          175

Pro Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu Gln Leu
          180          185          190

Gln Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Thr Asp
          195          200          205

Pro Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu Phe Gln

```

ES 2 559 361 T3

210

215

220

Gln Leu Leu Asn Gln Gly Ile Pro Val Ala Pro His Thr Thr Glu Pro
225 230 235 240

Met Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr Gly Ala
245 250 255

Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro Gly Leu
260 265 270

Pro Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala Asp
275 280 285

Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser
290 295 300

<210> 31

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción modificada de virus de insecto

<400> 31

gagggccgag gaagcttact aacatgcggt gacgtcgagg agaaccggg ccct 54

<210> 32

<211> 145

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción modificada de homeodominio de dedo de cinc y promotor mínimo de IL-2 humana

<400> 32

aatgatgggc gctcgagtaa tgatgggagg tcgactaatg atgggagctc gagtaatgat. 60

gggcgtctag ctaatgatgg ggcgtcgagt aatgatgggc ggtcgactaa tgatgggagc 120

tcgagtaatg atgggagctc agaac 145

<210> 33

<211> 1029

<212> ADN

<213> Bacteriófago P1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1029)

<400> 33

atg tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg cct gca tta ccg gtc Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val 1 5 10 15	48
gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc agg Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg 20 25 30	96
gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc gtt Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val 35 40 45	144
tgc cgg tgc tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg ttt Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe 50 55 60	192
ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag gcg Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala 65 70 75 80	240
cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta aac Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn 85 90 95	288
atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat gct Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala 100 105 110	336
gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc ggt Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly 115 120 125	384
gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln 130 135 140	432
gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn 145 150 155 160	480
ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc gaa Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu 165 170 175	528
att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg aga Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg 180 185 190	576
atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca ggt Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly 195 200 205	624
gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga tgg Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp 210 215 220	672
att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat cgg aat aac tac ctg ttt tgc Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys 225 230 235 240	720
cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag cta Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu 245 250 255	768

tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg att	816
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	
260 265 270	
tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct gga	864
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	
275 280 285	
cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga gtt	912
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val	
290 295 300	
tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat att	960
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile	
305 310 315 320	
gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg gtg	1008
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val	
325 330 335	
cgc ctg ctg gaa gat ggc gat	1029
Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp	
340	

<210> 34

<211> 343

<212> PRT

<213> Bacteriófago P1

<400> 34

Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
1 5 10 15

Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
20 25 30

Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
35 40 45

Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
50 55 60

Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
65 70 75 80

Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
85 90 95

Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
100 105 110

Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
115 120 125

Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
130 135 140

Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
145 150 155 160

Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
165 170 175

Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
180 185 190

Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
195 200 205

Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
210 215 220

Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
225 230 235 240

Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
245 250 255

Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
260 265 270

Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
275 280 285

His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
290 295 300

Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
305 310 315 320

Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
325 330 335

Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp
340

<210> 35
<211> 705
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> endonucleasa de levadura

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(705)

<400> 35

atg aag aac att aag aaa aat cag gtc atc aac ctg ggg ccc att tcc	48
Met Lys Asn Ile Lys Lys Asn Gln Val Ile Asn Leu Gly Pro Ile Ser	
1 5 10 15	
aag ctg ctg aaa gag tac aag tct cag ctg atc gaa ctg aat att gag	96
Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Ser Gln Leu Ile Glu Leu Asn Ile Glu	
20 25 30	
cag ttt gaa gca ggg atc ggc ctg att ctg ggc gac gcc tac atc agg	144
Gln Phe Glu Ala Gly Ile Gly Leu Ile Leu Gly Asp Ala Tyr Ile Arg	
35 40 45	
agc aga gat gag gga aag acc tat tgc atg cag ttc gaa tgg aag aac	192
Ser Arg Asp Glu Gly Lys Thr Tyr Cys Met Gln Phe Glu Trp Lys Asn	
50 55 60	
aaa gct tac atg gac cac gtg tgc ctg ctg tat gat cag tgg gtc ctg	240
Lys Ala Tyr Met Asp His Val Cys Leu Leu Tyr Asp Gln Trp Val Leu	
65 70 75 80	
tct ccc cct cac aag aaa gag cgg gtg aat cat ctg gga aac ctg gtc	288
Ser Pro Pro His Lys Lys Glu Arg Val Asn His Leu Gly Asn Leu Val	
85 90 95	
att act tgg ggg gca cag acc ttc aag cat cag gcc ttc aac aag ctg	336
Ile Thr Trp Gly Ala Gln Thr Phe Lys His Gln Ala Phe Asn Lys Leu	
100 105 110	
gct aac ctg ttt att gtg aac aat aag aag ctg atc cct aac aat ctg	384
Ala Asn Leu Phe Ile Val Asn Asn Lys Lys Leu Ile Pro Asn Asn Leu	
115 120 125	
gtc gaa aac tac ctg aca cca atg agt ctg gcc tat tgg ttc atg gac	432
Val Glu Asn Tyr Leu Thr Pro Met Ser Leu Ala Tyr Trp Phe Met Asp	
130 135 140	
gat ggc gga aaa tgg gac tac aac aag aac agc ctg aac aag agc atc	480
Asp Gly Gly Lys Trp Asp Tyr Asn Lys Asn Ser Leu Asn Lys Ser Ile	
145 150 155 160	
gtg ctg aac acc cag tcc ttc aca ttt gag gaa gtc gag tat ctg ctg	528
Val Leu Asn Thr Gln Ser Phe Thr Phe Glu Glu Val Glu Tyr Leu Leu	
165 170 175	
aag gga ctg agg aac aag ttc cag ctg aac tgc tac gtg aag att aac	576
Lys Gly Leu Arg Asn Lys Phe Gln Leu Asn Cys Tyr Val Lys Ile Asn	
180 185 190	
aag aac aag ccc atc atc tac atc gat tct atg agt tac ctg atc ttt	624
Lys Asn Lys Pro Ile Ile Tyr Ile Asp Ser Met Ser Tyr Leu Ile Phe	
195 200 205	
tat aat ctg att aag cca tac ctg atc ccc cag atg atg tat aaa ctg	672
Tyr Asn Leu Ile Lys Pro Tyr Leu Ile Pro Gln Met Met Tyr Lys Leu	
210 215 220	
cct aac aca atc agc tcc gag act ttc ctg aag	705
Pro Asn Thr Ile Ser Ser Glu Thr Phe Leu Lys	
225 230 235	

<211> 235
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 36

```

Met Lys Asn Ile Lys Lys Asn Gln Val Ile Asn Leu Gly Pro Ile Ser
1           5           10           15

Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Ser Gln Leu Ile Glu Leu Asn Ile Glu
20           25           30

Gln Phe Glu Ala Gly Ile Gly Leu Ile Leu Gly Asp Ala Tyr Ile Arg
35           40           45

Ser Arg Asp Glu Gly Lys Thr Tyr Cys Met Gln Phe Glu Trp Lys Asn
50           55           60

Lys Ala Tyr Met Asp His Val Cys Leu Leu Tyr Asp Gln Trp Val Leu
65           70           75           80

Ser Pro Pro His Lys Lys Glu Arg Val Asn His Leu Gly Asn Leu Val
85           90           95

Ile Thr Trp Gly Ala Gln Thr Phe Lys His Gln Ala Phe Asn Lys Leu
100          105          110

Ala Asn Leu Phe Ile Val Asn Asn Lys Lys Leu Ile Pro Asn Asn Leu
115          120          125

Val Glu Asn Tyr Leu Thr Pro Met Ser Leu Ala Tyr Trp Phe Met Asp
130          135          140

Asp Gly Gly Lys Trp Asp Tyr Asn Lys Asn Ser Leu Asn Lys Ser Ile
145          150          155          160

Val Leu Asn Thr Gln Ser Phe Thr Phe Glu Glu Val Glu Tyr Leu Leu
165          170          175

Lys Gly Leu Arg Asn Lys Phe Gln Leu Asn Cys Tyr Val Lys Ile Asn
180          185          190

```

10

Lys Asn Lys Pro Ile Ile Tyr Ile Asp Ser Met Ser Tyr Leu Ile Phe
195 200 205

Tyr Asn Leu Ile Lys Pro Tyr Leu Ile Pro Gln Met Met Tyr Lys Leu
210 215 220

Pro Asn Thr Ile Ser Ser Glu Thr Phe Leu Lys
225 230 235

<210> 37
<211> 221
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

cggggtggcat cctctgtgacc cctccccagt gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc 60
agtgccacc agccttgtcc taataaaatt aagttgcac attttgtctg actaggtgtc 120
cttctataat attatggggg ggaggggggg ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac 180
aacctgtagg gcctgcgggg tctattcggg aaccaagctg g 221

<210> 38
<211> 491
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> virus de la encefalomiocarditis

<400> 38

attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt 60
cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa 120
tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac 180
cctttgcagg cagcggaacc cccacactgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccaag 240
tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt 300
tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgccca 360
gaagggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt 420
ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt tttcctttga 480
aaaacacgat c 491

<210> 39
<211> 34
<212> ADN
<213> Bacteriófago P1

<400> 39

ataacttcgt atagcatata ttatacgaag ttat 34

<210> 40
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> luciferasa de luciérnaga nativa de tipo silvestre

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1650)

<400> 40

atg gaa gat gcc aaa aac att aag aag ggc cca gcg cca ttc tac cca	48
Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro	
1 5 10 15	
ctc gaa gac ggg acc gcc ggc gag cag ctg cac aaa gcc atg aag cgc	96
Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg	
20 25 30	
tac gcc ctg gtg ccc ggc acc atc gcc ttt acc gac gca cat atc gag	144
Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu	
35 40 45	
gtg gac att acc tac gcc gag tac ttc gag atg agc gtt cgg ctg gca	192
Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala	
50 55 60	
gaa gct atg aag cgc tat ggg ctg aat aca aac cat cgg atc gtg gtg	240
Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val	
65 70 75 80	
tgc agc gag aat agc ttg cag ttc ttc atg ccc gtg ttg ggt gcc ctg	288
Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu	
85 90 95	
ttc atc ggt gtg gct gtg gcc cca gct aac gac atc tac aac gag cgc	336
Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg	
100 105 110	
gag ctg ctg aac agc atg ggc atc agc cag ccc acc gtc gta ttc gtg	384
Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val	
115 120 125	
agc aag aaa ggg ctg caa aag atc ctc aac gtg caa aag aag cta ccg	432
Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro	
130 135 140	
atc ata caa aag atc atc atc atg gat agc aag acc gac tac cag ggc	480
Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly	
145 150 155 160	
ttc caa agc atg tac acc ttc gtg act tcc cat ttg cca ccc ggc ttc	528
Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe	
165 170 175	
aac gag tac gac ttc gtg ccc gag agc ttc gac cgg gac aaa acc atc	576
Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile	

15

180	185	190	
gcc ctg atc atg aac agt agt Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser 195	ggc agt acc gga ttg Gly Ser Thr Gly Leu 200	ccc aag ggc gta Pro Lys Gly Val 205	624
gcc cta ccg cac cgc acc gct tgt gtc cga ttc agt cat gcc cgc gac Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp 210 215 220			672
ccc atc ttc ggc aac cag atc atc ccc gac acc gct atc ctc agc gtg Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val 225 230 235 240			720
gtg cca ttt cac cac ggc ttc ggc atg ttc acc acg ctg ggc tac ttg Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu 245 250 255			768
atc tgc ggc ttt cgg gtc gtg ctc atg tac cgc ttc gag gag gag cta Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu 260 265 270			816
ttc ttg cgc agc ttg caa gac tat aag att caa tct gcc ctg ctg gtg Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val 275 280 285			864
ccc aca cta ttt agc ttc ttc gct aag agc act ctc atc gac aag tac Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr 290 295 300			912
gac cta agc aac ttg cac gag atc gcc agc ggc ggg gcg ccg ctc agc Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser 305 310 315 320			960
aag gag gta ggt gag gcc gtg gcc aaa cgc ttc cac cta cca ggc atc Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile 325 330 335			1008
cgc cag ggc tac ggc ctg aca gaa aca acc agc gcc att ctg atc acc Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr 340 345 350			1056
ccc gaa ggg gac gac aag cct ggc gca gta ggc aag gtg gtg ccc ttc Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe 355 360 365			1104
ttc gag gct aag gtg gtg gac ttg gac acc ggt aag aca ctg ggt gtg Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val 370 375 380			1152
aac cag cgc ggc gag ctg tgc gtc cgt ggc ccc atg atc atg agc ggc Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly 385 390 395 400			1200
tac gtt aac aac ccc gag gct aca aac gct ctc atc gac aag gac ggc Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly 405 410 415			1248
tgg ctg cac agc ggc gac atc gcc tac tgg gac gag gac gag cac ttc Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe 420 425 430			1296
ttc atc gtg gac cgg ctg aag agc ctg atc aaa tac aag ggc tac cag			1344

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 gta gcc cca gcc gaa ctg gag agc atc ctg ctg caa cac ccc aac atc 1392
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460
 ttc gac gcc ggg gtc gcc ggc ctg ccc gac gac gat gcc ggc gag ctg 1440
 Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Ala Gly Glu Leu
 465 470 475 480
 tcc gcc gca gtc gtc gtg ctg gaa cac ggt aaa acc atg acc gag aag 1488
 Ser Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 485 490 495
 gag atc gtg gac tat gtg gcc agc cag gtt aca acc gcc aag aag ctg 1536
 Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 500 505 510
 cgc ggt ggt gtt gtg ttc gtg gac gag gtg cct aaa gga ctg acc ggc 1584
 Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525
 aag ttg gac gcc cgc aag atc cgc gag att ctc att aag gcc aag aag 1632
 Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540
 ggc ggc aag atc gcc gtg 1650
 Gly Gly Lys Ile Ala Val
 545 550

<210> 41
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 41

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

85										90					95				
Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg				
			100					105					110						
Glu	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Gly	Ile	Ser	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Val				
		115					120					125							
Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Pro				
	130					135					140								
Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Lys	Thr	Asp	Tyr	Gln	Gly				
145					150					155					160				
Phe	Gln	Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Val	Thr	Ser	His	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe				
				165					170					175					
Asn	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile				
			180					185					190						
Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	Gly	Val				
		195					200					205							
Ala	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Ala	Cys	Val	Arg	Phe	Ser	His	Ala	Arg	Asp				
	210					215					220								
Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Gln	Ile	Ile	Pro	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Val				
225					230					235					240				
Val	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met	Phe	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Leu				
				245					250					255					
Ile	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Met	Tyr	Arg	Phe	Glu	Glu	Glu	Leu				
			260					265					270						
Phe	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Ile	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Val				
		275					280					285							
Pro	Thr	Leu	Phe	Ser	Phe	Phe	Ala	Lys	Ser	Thr	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr				
	290					295					300								
Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser				
305					310					315					320				
Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Arg	Phe	His	Leu	Pro	Gly	Ile				
				325					330					335					

Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
340 345 350

Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
370 375 380

Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
385 390 395 400

Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
405 410 415

Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
420 425 430

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
435 440 445

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu
465 470 475 480

Ser Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
530 535 540

Gly Gly Lys Ile Ala Val
545 550

- <210> 42
- <211> 239
- <212> ADN
- <213> Virus de simio 40
- <400> 42

```

ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa      60
tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca      120
ttataagctg caataaacia gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggttc      180
aggggggagat gtggggagggt ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatc      239

```

5 <210> 43
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> luciferasa de luciérnaga

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1650)

15 <400> 43

atg gag gac gcc aag aac atc aag aag ggc ccc gcc ccc ttc tac ccc Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro 1 5 10 15	48
ctg gag gac ggc acc gcc gga gag cag ctg cac aag gcc atg aag aga Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg 20 25 30	96
tac gcc ctg gtg ccc ggc acc atc gcc ttc acc gac gcc cac atc gag Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu 35 40 45	144
gtg gac atc acc tac gcc gag tac ttc gag atg agc gtg aga ctg gcc Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala 50 55 60	192
gag gcc atg aag aga tac ggc ctg aac acc aac cac aga atc gtg gtg Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val 65 70 75 80	240
tgc agc gag aac agc ctg cag ttc ttc atg ccc gtg ctg gga gcc ctg Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu 85 90 95	288
ttc atc ggc gtg gcc gtg gcc ccc gcc aac gac atc tac aac gag aga Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg 100 105 110	336
gag ctg ctg aac agc atg ggc atc agc cag ccc acc gtg gtg ttc gtg Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val 115 120 125	384
agc aag aag ggc ctg cag aag atc ctg aac gtg cag aag aag ctg ccc Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro 130 135 140	432
atc atc cag aag atc atc atc atg gac agc aag acc gac tac cag ggc Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly 145 150 155 160	480
ttc cag agc atg tat acc ttc gtg acc agc cac ctg ccc ccc ggc ttc	528

Phe	Gln	Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Val	Thr	Ser	His	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe		
				165					170					175			
aac	gag	tac	gac	ttc	gtg	ccc	gag	agc	ttc	gac	aga	gac	aag	acc	atc		576
Asn	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile		
			180					185					190				
gcc	ctg	atc	atg	aac	agc	agc	ggc	agc	acc	ggc	ctg	ccc	aag	ggc	gtg		624
Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	Gly	Val		
			195				200					205					
gcc	ctg	ccc	cac	aga	acc	gcc	tgc	gtg	aga	ttc	agc	cac	gcc	aga	gac		672
Ala	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Ala	Cys	Val	Arg	Phe	Ser	His	Ala	Arg	Asp		
			210				215				220						
ccc	atc	ttc	ggc	aac	cag	atc	atc	ccc	gac	acc	gcc	atc	ctg	agc	gtg		720
Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Gln	Ile	Ile	Pro	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Val		
					230				235						240		
gtg	ccc	ttc	cac	cac	ggc	ttc	ggc	atg	ttc	acc	acc	ctg	ggc	tac	ctg		768
Val	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met	Phe	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Leu		
				245				250						255			
atc	tgc	ggc	ttc	aga	gtg	gtg	ctg	atg	tat	aga	ttc	gag	gag	gag	ctg		816
Ile	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Met	Tyr	Arg	Phe	Glu	Glu	Glu	Leu		
				260				265					270				
ttc	ctg	aga	agc	ctg	cag	gac	tac	aag	atc	cag	agc	gcc	ctg	ctg	gtg		864
Phe	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Ile	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Val		
				275				280				285					
ccc	acc	ctg	ttc	agc	ttc	ttc	gcc	aag	agc	acc	ctg	atc	gac	aag	tac		912
Pro	Thr	Leu	Phe	Ser	Phe	Phe	Ala	Lys	Ser	Thr	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr		
				290			295				300						
gac	ctg	agc	aac	ctg	cac	gag	atc	gcc	agc	ggc	gga	gcc	ccc	ctg	agc		960
Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser		
					310				315					320			
aag	gag	gtg	ggc	gag	gcc	gtg	gcc	aag	aga	ttc	cac	ctg	ccc	ggc	atc		1008
Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Arg	Phe	His	Leu	Pro	Gly	Ile		
				325				330						335			
aga	cag	ggc	tac	ggc	ctg	acc	gag	acc	acc	agc	gcc	atc	ctg	atc	acc		1056
Arg	Gln	Gly	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Ala	Ile	Leu	Ile	Thr		
				340				345					350				
ccc	gag	ggc	gac	gac	aag	ccc	gga	gcc	gtg	ggc	aag	gtg	gtg	ccc	ttc		1104
Pro	Glu	Gly	Asp	Asp	Lys	Pro	Gly	Ala	Val	Gly	Lys	Val	Val	Pro	Phe		
				355			360					365					
ttc	gag	gcc	aag	gtg	gtg	gac	ctg	gac	acc	ggc	aag	acc	ctg	ggc	gtg		1152
Phe	Glu	Ala	Lys	Val	Val	Asp	Leu	Asp	Thr	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Val		
				370			375					380					
aac	cag	aga	ggc	gag	ctg	tgc	gtg	aga	ggc	ccc	atg	att	atg	tcc	ggc		1200
Asn	Gln	Arg	Gly	Glu	Leu	Cys	Val	Arg	Gly	Pro	Met	Ile	Met	Ser	Gly		
				385		390			395					400			
tac	gtg	aac	aac	ccc	gag	gcc	acc	aac	gcc	ctg	atc	gac	aag	gac	ggc		1248
Tyr	Val	Asn	Asn	Pro	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Leu	Ile	Asp	Lys	Asp	Gly		
				405				410						415			

tgg ctg cac agc ggc gac atc gcc tac tgg gac gag gac gag cac ttc	1296
Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe	
420 425 430	
ttc atc gtg gac aga ctg aag agc ctg atc aag tac aag ggc tac cag	1344
Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln	
435 440 445	
gtg gcc ccc gcc gag ctg gag agc atc ctg ctg cag cac ccc aac atc	1392
Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile	
450 455 460	
ttc gac gcc gga gtg gcc gga ctg ccc gac gac gac gcc gga gag ctg	1440
Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu	
465 470 475 480	
ccc gcc gcc gtg gtg gtg ctg gag cac ggc aag acc atg acc gag aag	1488
Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys	
485 490 495	
gag atc gtg gac tac gtg gcc agc cag gtg aca acc gcc aag aag ctg	1536
Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu	
500 505 510	
aga ggc ggc gtg gtg ttc gtg gac gag gtg ccc aag ggc ctg acc ggc	1584
Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly	
515 520 525	
aag ctg gac gcc aga aag atc aga gag atc ctg atc aag gcc aag aag	1632
Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys	
530 535 540	
ggc gcc aag atc gcc gtg	1650
Gly Gly Lys Ile Ala Val	
545 550	

<210> 44

<211> 550

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 44

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

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

Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
325 330 335

Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
340 345 350

Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
370 375 380

Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
385 390 395 400

Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
405 410 415

Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
420 425 430

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
435 440 445

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu
465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
530 535 540

Gly Gly Lys Ile Ala Val
545 550

<210> 45
<211> 411

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> construcción modificada de NLS de c-Myc, homeodominio de dedo de cinc y FKBP

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

10

<400> 45

atg gac tat cct gct gcc aag agg gtc aag ttg gac tct aga gaa cgc	48
Met Asp Tyr Pro Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Arg Glu Arg	
1 5 10 15	
cca tat gct tgc cct gtc gag tcc tgc gat cgc cgc ttt tct cgc tcg	96
Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser	
20 25 30	
gat gag ctt acc cgc cat atc cgc atc cac aca ggc cag aag ccc ttc	144
Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe	
35 40 45	
cag tgt cga atc tgc atg cgt aac ttc agt cgt agt gac cac ctt acc	192
Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr	
50 55 60	
acc cac atc cgc acc cac aca ggc ggc ggc cgc agg agg aag aaa cgc	240
Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg	
65 70 75 80	
acc agc ata gag acc aac atc cgt gtg gcc tta gag aag agt ttc ttg	288
Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu	
85 90 95	
gag aat caa aag cct acc tcg gaa gag atc act atg att gct gat cag	336
Glu Asn Gln Lys Pro Thr Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln	
100 105 110	
ctc aat atg gaa aaa gag gtg att cgt gtt tgg ttc tgt aac cgc cgc	384
Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg	
115 120 125	
cag aaa gaa aaa aga atc aac act aga	411
Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn Thr Arg	
130 135	

15

<210> 46

<211> 137

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 46

Met Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Arg Glu Arg
1 5 10 15

Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe
35 40 45

Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr
50 55 60

Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg
65 70 75 80

Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu
85 90 95

Glu Asn Gln Lys Pro Thr Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln
100 105 110

Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg
115 120 125

Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn Thr Arg
130 135

<210> 47
<211> 897
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción modificada de SV40 y FRAP

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 47

atg	ccc	aag	aag	aag	aga	aag	gtg	atc	ctg	tgg	cac	gag	atg	tgg	cac		48
Met	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ile	Leu	Trp	His	Glu	Met	Trp	His		
1				5					10					15			
gag	ggc	ctg	gag	gag	gcc	agc	aga	ctg	tac	ttc	ggc	gag	aga	aac	gtg		96
Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr	Phe	Gly	Glu	Arg	Asn	Val		
		20						25					30				
aag	ggc	atg	ttc	gag	gtg	ctg	gag	ccc	ctg	cac	gcc	atg	atg	gag	aga		144
Lys	Gly	Met	Phe	Glu	Val	Leu	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Met	Met	Glu	Arg		
		35					40					45					
ggc	ccc	cag	acc	ctg	aag	gag	acc	agc	ttc	aac	cag	gct	tac	ggc	aga		192
Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Ala	Tyr	Gly	Arg		
	50					55					60						

gac ctg atg gag gcc cag gag tgg tgc aga aag tac atg aag tcc ggc	240
Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly	
65 70 75 80	
aac gtg aag gac ctg ctg cag gct tgg gac ctg tac tac cac gtg ttc	288
Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe	
85 90 95	
aga aga atc agc aag cag ctg ccc cag ctg act agt gac gag ttc ccc	336
Arg Arg Ile Ser Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Asp Glu Phe Pro	
100 105 110	
acc atg gtg ttc ccc agc ggc cag atc agc cag gcc agc gcc ctg gcc	384
Thr Met Val Phe Pro Ser Gly Gln Ile Ser Gln Ala Ser Ala Leu Ala	
115 120 125	
ccc gcc ccc ccc cag gtg ctg ccc cag gcc ccc gcc ccc gcc ccc gcc	432
Pro Ala Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala	
130 135 140	
ccc gcc atg gtg agc gcc ctg gcc cag gcc ccc gcc ccc gtg ccc gtg	480
Pro Ala Met Val Ser Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ala Pro Val Pro Val	
145 150 155 160	
ctg gcc ccc ggc ccc ccc cag gcc gtg gcc ccc ccc gcc ccc aag ccc	528
Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gln Ala Val Ala Pro Pro Ala Pro Lys Pro	
165 170 175	
acc cag gcc gga gag ggc acc ctg agc gag gcc ctg ctg cag ctg cag	576
Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu Gln Leu Gln	
180 185 190	
ttc gac gac gag gac ctg gga gcc ctg ctg ggc aac agc acc gac ccc	624
Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Thr Asp Pro	
195 200 205	
gcc gtg ttc acc gac ctg gcc agc gtg gac aac agc gag ttc cag cag	672
Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu Phe Gln Gln	
210 215 220	
ctg ctg aac cag ggc atc ccc gtg gcc ccc cac acc acc gag ccc atg	720
Leu Leu Asn Gln Gly Ile Pro Val Ala Pro His Thr Thr Glu Pro Met	
225 230 235 240	
ctg atg gag tac ccc gag gcc atc acc aga ctg gtc aca gga gcc cag	768
Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr Gly Ala Gln	
245 250 255	
aga ccc ccc gac ccc gcc ccc gcc ccc ctg gga gcc ccc ggc ctg ccc	816
Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro Gly Leu Pro	
260 265 270	
aac ggc ctg ctc agc ggc gac gag gac ttc agc agc atc gcc gac atg	864
Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala Asp Met	
275 280 285	
gac ttc agc gcc ctg ctg agc cag atc agc agc	897
Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser	
290 295	

<210> 48

<211> 299

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 48

5

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Leu Trp His Glu Met Trp His
1 5 10 15

Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val
20 25 30

Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg
35 40 45

Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg
50 55 60

Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly
65 70 75 80

Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe
85 90 95

Arg Arg Ile Ser Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Asp Glu Phe Pro
100 105 110

Thr Met Val Phe Pro Ser Gly Gln Ile Ser Gln Ala Ser Ala Leu Ala
115 120 125

Pro Ala Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
130 135 140

Pro Ala Met Val Ser Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ala Pro Val Pro Val
145 150 155 160

Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gln Ala Val Ala Pro Pro Ala Pro Lys Pro
165 170 175

Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu Gln Leu Gln
180 185 190

Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Thr Asp Pro
195 200 205

Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu Phe Gln Gln
210 215 220

Leu Leu Asn Gln Gly Ile Pro Val Ala Pro His Thr Thr Glu Pro Met
225 230 235 240

Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr Gly Ala Gln
245 250 255

Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro Gly Leu Pro
260 265 270

Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala Asp Met
275 280 285

Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser
290 295

<210> 49

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción modificada de ZFHD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 49

atg gag aga ccc tac gcc tgc ccc gtg gag agc tgc gac aga aga ttc 48
Met Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe
1 5 10 15

agc aga agc gac gag ctg acc aga cac atc aga atc cac acc ggc cag 96
Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln
20 25 30

aag ccc ttc cag tgc aga atc tgc atg aga aac ttc agc aga agc gac 144
Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp
35 40 45

cac ctg acc acc cac atc aga acc cac aca ggc ggc ggc aga aga aga 192
His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg
50 55 60

aag aag aga acc agc atc gag acc aac atc aga gtg gcc ctg gag aaa 240
Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys
65 70 75 80

agc ttc ctg gag aac cag aag ccc acc agc gag gag atc acc atg atc 288
Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile
85 90 95

gcc gac cag ctg aac atg gag aag gag gtg atc aga gtg tgg ttc tgc 336
Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys
100 105 110

aac aga aga cag aag gag aag aga atc aac 366
Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn
115 120

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 10 <400> 50

 Met Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe
 1 5 10 15

 Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln
 20 25 30

 Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp
 35 40 45

 His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg
 50 55 60

 Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys
 65 70 75 80

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

 Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu Val Ile Arg Val Trp Phe Cys
 100 105 110

 Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile Asn
 115 120

 15 <210> 51
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> construcción modificada de SV40 y ZFHD

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(387)
 25 <400> 51

atg ccc aag aag aag aga aag gtg gag aga ccc tac gcc tgc ccc gtg 48
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val

1	5				10				15							
gag	agc	tgc	gac	aga	aga	ttc	agc	aga	agc	gac	gag	ctg	acc	aga	cac	96
Glu	Ser	Cys	Asp	Arg	Arg	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Thr	Arg	His	
			20					25					30			

atc aga atc cac acc ggc cag aag ccc ttc cag tgc aga atc tgc atg 144
Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
35 40 45

aga aac ttc agc aga agc gac cac ctg acc acc cac atc aga acc cac 192
Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His
50 55 60

aca ggc ggc ggc aga aga aga aag aag aga acc agc atc gag acc aac 240
Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn
65 70 75 80

atc aga gtg gcc ctg gag aaa agc ttc ctg gag aac cag aag ccc acc 288
Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr
85 90 95

agc gag gag atc acc atg atc gcc gac cag ctg aac atg gag aag gag 336
 Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu
 100 105 110

gtg atc aga gtg tgg ttc tgc aac aga aga cag aag gag aag aga atc 384
Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile
115 120 125

aac	387
Asn	

<210> 52
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 52

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val
1 5 10 15

Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His
20 25 30

Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
35 40 45

Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His
50 55 60

Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Thr Asn
65 70 75 80

Ile Arg Val Ala Leu Glu Lys Ser Phe Leu Glu Asn Gln Lys Pro Thr
85 90 95

Ser Glu Glu Ile Thr Met Ile Ala Asp Gln Leu Asn Met Glu Lys Glu
100 105 110

Val Ile Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Ile
115 120 125

Asn

<210> 53
<211> 324
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> FKBP de tipo silvestre

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 53

atg gga gtg cag gtg gaa acc atc tcc cca gga gac ggg cgc acc ttc	48
Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe	
1 5 10 15	
ccc aag cgc ggc cag acc tgc gtg gtg cac tac acc ggg atg ctt gaa	96
Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu	
20 25 30	
gat gga aag aaa ttt gat tcc tcc cgg gac aga aac aag ccc ttt aag	144
Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys	
35 40 45	
ttt atg cta ggc aag cag gag gtg atc cga ggc tgg gaa gaa ggg gtt	192
Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val	
50 55 60	
gcc cag atg agt gtg ggt cag aga gcc aaa ctg act ata tct cca gat	240
Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp	
65 70 75 80	
tat gcc tat ggt gcc act ggg cac cca ggc atc atc cca cca cat gcc	288
Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala	
85 90 95	
act ctc gtc ttc gat gtg gag ctt cta aaa ctg gaa	324
Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu	
100 105	

<210> 54
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 54

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
1 5 10 15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
20 25 30

Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
35 40 45

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

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
65 70 75 80

Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala
85 90 95

Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
100 105

<210> 55
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción modificada de FKBP

<400> 55

ggcgtgcagg tggagaccat cagccccggc gacggcagaa ccttcccca gagaggccag 60
acctgcgtgg tgcactacac cggaatgctg gaggacggca agaagttcga cagcagcaga 120
gacagaaaca agcccttcaa gttcatgctg ggcaagcagg aggtgatcag aggctgggag 180
gagggcgctgg ccagatgag cgtggggccag agagccaagc tgaccatcag ccccgactac 240
gcctacggag ccaccggcca ccccggcac atcccccccc acgccaccct ggtgttcgac 300
gtggagctgc tgaagctgga g 321

<210> 56
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción modificada de FKBP

<400> 56

	ggcgtgcagg tcgagacat cagccccggc gacggccgca cctttcccaa gagaggccag	60
	acttgcgtgg tccactaac cggcatgctg gaggacggca agaagttcga cagcagccgc	120
	gaccgcaaca agcccttcaa gttcatgctg ggcaaacagg aagtgatccg cggctgggag	180
	gaaggcgtgg ctcagatgag cgtggggcag cgggccaagc tgaccatcag ccccgactat	240
	gcctacggcg ccaccggcca ccccggcac atccccccc acgccaccct ggtgttcgac	300
	gtggagctgc tgaagctgga gtga	324
5	<210> 57 <211> 321 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> construcción modificada de FKBP <400> 57	
	ggcggttcagg tggaaccat cagtccaggg gatggccgaa cttttccaaa gagagggcag	60
	acttgcgtcg tgcattatac tggatgctg gaggatggga aaaagttcga ctcttcaga	120
	gatcggaaca aaccattcaa attcatgctc gggaaacagg aagttatccg cggatgggag	180
	gagggcgtgg ccagatgtc cgtggggcag cgcgccaagc taaccatctc ccagactac	240
	gcctacggag ccaccggaca ccccggtatc atacccccc acgccaccct tgtgtttgac	300
	gtggaactgc ttaagctaga g	321
15	<210> 58 <211> 321 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> construcción modificada de FKBP <400> 58	
	ggcgtacaag tagagactat aagtcctggt gatggaagga cttttccaaa aagaggacaa	60
	acatgtgtag ttcattatac gggtatggtg gaggacggca aaaagttcga cagtagtaga	120
	gatcgtaata aaccattcaa attcatggtg ggtaaacaag aagtcattag gggatgggag	180
	gagggagtcg ctcaaattgc ggttggaaca cgtgctaagt taacaatcag ccctgactac	240
	gcatacggag ctacaggaca tcctggtatt atacctcccc acgctacctt ggtgtttgac	300
	gtcgaactgc tgaagttaga g	321
25		
30	<210> 59 <211> 1449 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Enzima FokI modificada	

	<220> <221> CDS <222> (1)..(1449)
5	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(84) <223> dedo de cinc N1
10	<220> <221> misc_feature <222> (85)..(168) <223> dedo de cinc N2
15	<220> <221> misc_feature <222> (169)..(252) <223> dedo de cinc N3
20	<220> <221> misc_feature <222> (253)..(336) <223> dedo de cinc N4
25	<220> <221> misc_feature <222> (337)..(420) <223> dedo de cinc N5
30	<220> <221> misc_feature <222> (421)..(504) <223> dedo de cinc N6
35	<220> <221> misc_feature <222> (505)..(588) <223> dedo de cinc N7
40	<220> <221> misc_feature <222> (589)..(672) <223> dedo de cinc N8
45	<220> <221> misc_feature <222> (673)..(756) <223> dedo de cinc N9
50	<220> <221> misc_feature <222> (757)..(840) <223> dedo de cinc N10
55	<220> <221> misc_feature <222> (841)..(855) <223> enlazador de 5 aminoácidos
60	<220> <221> misc_feature <222> (856)..(1443) <223> Dominio catalítico de FokI
65	<400> 59

atg ggc gag aag ccc tac aag tgc cct gag tgc ggc aag agc ttc agc Met Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser 1 5 10 15	48
cag aga aga agc ctg ggc cac cac cag cgt acg cac ccc ggc gag aaa Gln Arg Arg Ser Leu Gly His His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys 20 25 30	96
cct tat aag tgt ccc gaa tgt ggc aag tcc ttc agc aag aag aac gac Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Lys Lys Asn Asp 35 40 45	144
ctg acc cgg cac cag cgg aca cac ccc ggg gaa aag cca tac aaa tgt Leu Thr Arg His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys 50 55 60	192
cca gag tgt ggg aag tct ttc tcc agc cgg cgg acc tgc aga gcc cat Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Ser Arg Arg Thr Cys Arg Ala His 65 70 75 80	240
cag aga aca cat acc ggg gag aag cct ttc cag tgc cgg atc tgc atg Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met 85 90 95	288
aga aac ttc agc gtg cgg cac aac ctg acc aga cac ctg agg acc cat Arg Asn Phe Ser Val Arg His Asn Leu Thr Arg His Leu Arg Thr His 100 105 110	336
acc ggc gaa aaa ccc ttt cag tgc aga atc tgt atg cgg aac ttc tcc Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser 115 120 125	384
gac cgg acc agc ctg gcc cgg cat ctg aga act cat cct ggg gaa aag Asp Arg Thr Ser Leu Ala Arg His Leu Arg Thr His Pro Gly Glu Lys 130 135 140	432
ccc tat aag tgt cca gaa tgc ggg aaa tcc ttt agc gac agc ggc aac Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Asp Ser Gly Asn 145 150 155 160	480
ctg cgg gtg cac cag agg act cat cca ggc gag aaa ccc tac aaa tgc Leu Arg Val His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys 165 170 175	528
ccc gaa tgc gga aag tca ttc tcc cac acc ggc cat ctg ctc gag cat Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser His Thr Gly His Leu Leu Glu His 180 185 190	576
cag cgg acc cac act ggg gag aaa cca ttt cag tgt cgc atc tgt atg Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met 195 200 205	624
agg aat ttc agc acc aac cag gcc ctg ggc gtg cac ctg aga aca cac Arg Asn Phe Ser Thr Asn Gln Ala Leu Gly Val His Leu Arg Thr His	672

210	215	220	
cca ggc gag aag cct tac aag tgt cca gag tgc gga aag tca ttt tcc Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser 225 230 235 240			720
gtg cgc cac aat ctg aca cgg cat cag cgc acc cat ccc ggc gag aag Val Arg His Asn Leu Thr Arg His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys 245 250 255			768
cct tac aaa tgc ccc gag tgt ggc aaa tct ttc agt gac cgg acc tct Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Asp Arg Thr Ser 260 265 270			816
ctg gcc aga cat cag agg aca cac ggc act agt ggc aag cag ctg gtg Leu Ala Arg His Gln Arg Thr His Gly Thr Ser Gly Lys Gln Leu Val 275 280 285			864
aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc gag ctg cgg cac aag ctg aaa Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys 290 295 300			912
tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg atc gag atc gcc cgg aac ccc Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Pro 305 310 315 320			960
acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag gtc atg gaa ttt ttc atg aag Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys 325 330 335			1008
gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg ggc ggc agc aga aaa ccc gac Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp 340 345 350			1056
ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc atc gac tac ggc gtg atc gtg Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val 355 360 365			1104
gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac aac ctg ccc atc gga cag gcc Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala 370 375 380			1152
gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag aac cag acc cgg aac aag cac Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His 385 390 395 400			1200
atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg tac ccc agc agc gtg acc gag Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu 405 410 415			1248
ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac ttc aag ggc aac tac aag gcc Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala 420 425 430			1296
cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc aac tgc aac ggc gct gtg ctg Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu 435 440 445			1344
agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc gag atg atc aag gcc ggc acc Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr 450 455 460			1392
ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag ttc aac aac ggc gag atc aac			1440

Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn
465 470 475 480

ttc tga tag
Phe

1449

<210> 60

<211> 481

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 60

Met Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser
1 5 10 15

Gln Arg Arg Ser Leu Gly His His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys
20 25 30

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Lys Lys Asn Asp
35 40 45

Leu Thr Arg His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys
50 55 60

Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Ser Arg Arg Thr Cys Arg Ala His
65 70 75 80

Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met
85 90 95

Arg Asn Phe Ser Val Arg His Asn Leu Thr Arg His Leu Arg Thr His
100 105 110

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser
115 120 125

Asp Arg Thr Ser Leu Ala Arg His Leu Arg Thr His Pro Gly Glu Lys
130 135 140

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Asp Ser Gly Asn
145 150 155 160

Leu Arg Val His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys
165 170 175

Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser His Thr Gly His Leu Leu Glu His

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

Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu
435 440 445

Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr
450 455 460

Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn
465 470 475 480

Phe

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 61

Gln Arg Ala Asn Leu Arg Ala
1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 62

Gln Arg Ser Asn Leu Lys Val
1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 63

Asp Arg Ser Asn Arg Lys Thr
1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 64

Asp Ser Gly Asn Leu Arg Val
1 5

5 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 65

Gly Ala Ser Ala Leu Arg Gln
1 5

15 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 66

Gly Ala Ser Ala Leu Arg Ser
1 5

25 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35 <400> 67

Gly Gly Thr Ala Leu Arg Met
1 5

40 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 68

Gly Gly Thr Ala Leu Val Met
1 5

50 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 559 361 T3

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 69

Gly His Thr Ala Leu Ala Leu
1 5

5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 70

Gly His Thr Ala Leu Arg His
1 5

20

<210> 71

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 71

Gly His Thr Ala Leu Arg Asn
1 5

30

<210> 72

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 72

40

Gly Pro Thr Ala Leu Val Asn
1 5

<210> 73

$\langle 211 \rangle$ 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 73

His Arg Thr Asn Leu Ile Ala
1 5

55

<210> 74

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 74

Arg Lys Asp Asn Leu Lys Asn
1 5

10 <210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 75

Arg Ser Ala Asn Leu Ser Val
1 5

20 <210> 76
<211> 7
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 76

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Val
1 5

35 <210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 77

Arg Ser Asp Asn Leu Thr Gln
1 5

45 <210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 78

55

Thr Ser Ser Asn Arg Lys Thr
1 5

<210> 79

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 79

Thr Thr Gly Asn Leu Thr Val
 1 5

10

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

20

<400> 80

Val Ser Ser Asn Leu Asn Val
 1 5

25

<210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 81

Gln Asn Ala Thr Arg Ile Asn
 1 5

35

<210> 82
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 82

45

Ser Pro Ala Asp Leu Thr Arg
 1 5

50

<210> 83
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 83

Asp Lys Lys Asp Leu Thr Arg
1 5

5
 <210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 84

Ala Ser Ala Asp Leu Thr Arg
1 5

15
 <210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 85

Lys Gly Asn Asp Leu Thr Arg
1 5

25
 <210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35
 <400> 86

Lys Asn Asn Asp Leu Thr Arg
1 5

40
 <210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 87

Lys Arg Ile Asp Leu Gln Arg
1 5

50
 <210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

	<400> 88	
		Gln Asn Ala Thr Arg Lys Arg
		1 5
5	<210> 89	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 89	
15		Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
		1 5
	<210> 90	
	<211> 7	
20	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
25	<400> 90	
		Arg Lys His Asp Leu Asn Met
		1 5
30	<210> 91	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 91	
		Arg Asn Ile Thr Leu Val Arg
40		1 5
	<210> 92	
	<211> 7	
	<212> PRT	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
50	<400> 92	
		Arg Arg Gln Thr Leu Arg Gln
		1 5
	<210> 93	
55	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 93

5

Arg Ser His Asp Leu Thr Val
1 5

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 94

Arg Ser Gln Thr Leu Ala Gln
1 5

20

<210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 95

Arg Thr Asp Thr Leu Arg Asp
1 5

30

<210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 96

40

Ala Arg Ser Thr Arg Thr Asn
1 5

<210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50

<400> 97

His Ala Ser Thr Arg His Cys
1 5

55

<210> 98
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 98

Thr His Leu Asp Leu Ile Arg
1 5

10 <210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 99

Lys Asn Trp Lys Leu Gln Ala
1 5

20 <210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 100

Gln Leu Ala His Leu Arg Ala
1 5

30 <210> 101
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 101

Gln Ser Ser His Leu Thr Thr
1 5

45 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 102

Arg Ser Ala Asn Leu Ala Arg
1 5

55 <210> 103
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 103

Glu Arg Ser His Leu Arg Glu
1 5

<210> 104

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 104

Asp Ser Ala His Leu Thr Arg
1 5

<210> 105

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 105

Gln Ser Ala His Arg Thr Lys
1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 106

Arg Gly Asn His Leu Val Val
1 5

<210> 107

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 107

Arg Met Ala His Leu His Ala
1 5

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 108

Arg Asn Glu His Leu Lys Val
 1 5

10 <210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 109

Arg Pro His His Leu Asp Ala
 1 5

20 <210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 110

Arg Arg Ala His Leu Leu Asn
 1 5

30 <210> 111
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 111

Arg Arg Ala His Leu Leu Ser
 1 5

45 <210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 112

Arg Arg Ala His Leu Arg Gln
 1 5

55 <210> 113
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 118

Arg Ser Asp His Leu Thr Gln
1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 119

Arg Ser Ser His Leu Lys Met
1 5

<210> 120

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 120

His Arg Thr Thr Leu Thr Asn
1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 121

Gln Ser Ala His Leu Ser Thr
1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 122

Gln Lys Ser Ser Leu Ile Ala
1 5

<210> 123

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 123
 5
 Arg Arg Asp Glu Leu Asn Val
 1 5

 <210> 124
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 15 <400> 124

 Arg Ser Asp Ser Leu Ser Val
 1 5

 20 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 125

 His Lys Asn Ala Leu Gln Asn
 1 5
 30

 <210> 126
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 40 <400> 126

 Asp Arg Ala Asn Leu Ser Thr
 1 5

 45 <210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 50 <400> 127

 Gln Lys Ser Asn Leu Ile Ile
 1 5
 55

 <210> 128
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 128

Gln Ser Gly Asn Leu Thr Glu
1 5

10 <210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 129

Gln Ser Ser Asn Leu Thr Val
1 5

20 <210> 130
<211> 7
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 130

Ser Lys Lys Ala Leu Thr Glu
1 5

35 <210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 131

Asp Ser Ala Asn Arg Thr Lys
1 5

45 <210> 132
<211> 7
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 132

55 <210> 133
<211> 7

Arg Ala Asp Asn Leu Thr Glu
1 5

5 <210> 138
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 10 <400> 138
 Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg
 1 5
 15 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 20 <400> 139
 Asn Arg Thr Asp Leu Ile Arg
 1 5
 25 <210> 140
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 140
 35 Gln Asn Ser Thr Arg Ile Gly
 1 5
 40 <210> 141
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 45 <400> 141
 Thr Ser His Ser Leu Thr Glu
 1 5
 50 <210> 142
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 142
 Ser Lys Lys His Leu Ala Glu
 1 5

5	<210> 143 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 143
	Asp Ser Ser Ser Leu Thr Arg 1 5
15	<210> 144 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 144
	Asp Tyr Asp Val Arg Lys Arg 1 5
25	<210> 145 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 145
35	Arg Asn Asp Thr Leu Thr Glu 1 5
40	<210> 146 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 146
	Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu 1 5
50	<210> 147 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 147

Thr Lys Asn Ser Leu Thr Glu
1 5

5
 <210> 148
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 148

Gln Ser Gly His Leu Thr Glu
1 5

15
 <210> 149
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 149

Gln Ser Ser His Leu Asn Val
1 5

25
 <210> 150
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35
 <400> 150

Gln Ser Thr His Leu Thr Gln
1 5

40
 <210> 151
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 151

His Thr Gly His Leu Leu Glu
1 5

50
 <210> 152
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 152

Arg Ser Asp Asn Leu Thr Glu
1 5

5 <210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 153

Arg Ser Asp Lys Leu Thr Glu
1 5

15 <210> 154
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 154

Arg Ser Gln Thr Arg Lys Thr
1 5

30 <210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 155

Ser Arg Arg Thr Cys Arg Ala
1 5

40 <210> 156
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 156

50 **Asp Ser Ser Ser Arg Thr Lys**
1 5

<210> 157
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 157

Gln Asn Ser Thr Leu Thr Glu
1 5

<210> 158
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 158

Ala Ser Asp Asp Leu Thr Gln
1 5

20 <210> 159
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 159

His Asn Tyr Ala Arg Asp Cys
1 5

30 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 160

Arg Asn Asp Ala Leu Thr Glu
1 5

45 <210> 161
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50 <400> 161

Arg Ser Asp Ala Leu Arg Glu
1 5

55 <210> 162
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 162

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Ala
1 5

10 <210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 163

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Asn
1 5

20 <210> 164
<211> 7
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 164

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu
1 5

35 <210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 165

Thr Thr Gly Ala Leu Thr Glu
1 5

45 <210> 166
<211> 7
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 166

55 <210> 167
<211> 7

His Lys Pro Asn Leu His Arg
1 5

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 167

10 **His Arg Pro Asn Leu Thr Arg**
1 5

<210> 168
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 168

20 **Leu Gly Glu Asn Leu Arg Arg**
1 5

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 169

Gln Ala Ser Asn Leu Ala Arg
1 5

35 <210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 170

Gln Ala Ser Asn Leu Leu Arg
1 5

45 <210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

55 <400> 171

Gln Ala Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 172

ES 2 559 361 T3

	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 172
10	Gln Asp Gly Asn Leu Gly Arg 1 5
	<210> 173
	<211> 7
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
20	<400> 173
	Gln Asp Gly Asn Leu Thr Arg 1 5
	<210> 174
25	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
30	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 174
	Gln Gly Ser Asn Leu Ala Arg 1 5
35	<210> 175
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 175
45	Gln His Pro Asn Leu Thr Arg 1 5
	<210> 176
	<211> 7
50	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
55	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 176
	Gln Lys Gly Asn Leu Leu Arg 1 5

ES 2 559 361 T3

	<210> 177	
	<211> 7	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
10	<400> 177	
		Gln Lys Ser Asn Leu Ile Arg
		1 5
	<210> 178	
	<211> 7	
15	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
20	<400> 178	
		Gln Leu Ser Asn Leu Thr Arg
		1 5
25	<210> 179	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
	<400> 179	
		Gln Gln Ser Asn Leu Ser Arg
35		1 5
	<210> 180	
	<211> 7	
	<212> PRT	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
45	<400> 180	
		Gln Gln Thr Asn Leu Thr Arg
		1 5
50	<210> 181	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
	<400> 181	
		Gln Arg Asn Asn Leu Gly Arg
		1 5

ES 2 559 361 T3

<210> 182
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

10

<400> 182

Gln Arg Ser Asn Leu Ala Arg
 1 5

<210> 183
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

20

<400> 183

Gln Arg Ser Asn Leu Val Arg
 1 5

25

<210> 184
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

<400> 184

35

Gln Arg Thr Asn Leu Gln Arg
 1 5

<210> 185
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

45

<400> 185

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
 1 5

50

<210> 186
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

<400> 186

Gln Ser Asn Asn Leu Asn Arg
1 5

5 <210> 187
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 187

Gln Ser Ser Asn Leu Thr Lys
1 5

15 <210> 188
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 188

Gln Ser Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

25 <210> 189
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

35 <400> 189

Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg
1 5

40 <210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 190

Gln Thr Asn Asn Leu Gly Arg
1 5

50 <210> 191
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 191

Gln Thr Asn Asn Leu Asn Arg
1 5

5 <210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 192

Gln Thr Asn Asn Leu Thr Arg
1 5

15 <210> 193
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 193

Gln Thr Val Asn Leu Asp Arg
1 5

30 <210> 194
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 194

Arg Lys Pro Asn Leu Leu Arg
1 5

40 <210> 195
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 195

50 **Thr Thr Thr Asn Leu Arg Arg**
1 5

55 <210> 196
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 196

Cys Pro Ser Asn Leu Arg Arg
1 5

5 <210> 197
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 197

Asp Asp Ala Asn Leu Arg Arg
1 5

15 <210> 198
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 198

Asp Glu Ala Asn Leu Arg Arg
1 5

<210> 199
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 199

Asp Leu Ser Asn Leu Lys Arg
1 5

40 <210> 200
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 200

50 <210> 201
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

Asp Met Gly Asn Leu Gly Arg
1 5

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 201

Asp Pro Ala Asn Leu Arg Arg
1 5

5 <210> 202
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 202

Asp Pro Gly Asn Leu Val Arg
1 5

15 <210> 203
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 203

Asp Pro Ser Asn Leu Ile Arg
1 5

30 <210> 204
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 204

Asp Pro Ser Asn Leu Gln Arg
1 5

40 <210> 205
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 205

50 <210> 206
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 206

Asp Gln Gly Asn Leu Ile Arg
1 5

5

<210> 207

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 207

Asp Arg Ala Asn Leu Ser Arg
1 5

20

<210> 208

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 208

Asp Arg Gly Asn Leu Thr Arg
1 5

30

<210> 209

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 209

40

Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 210

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 210

Glu Glu Ala Asn Leu Arg Arg
1 5

55

<210> 211

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 211

Glu Glu Ser Asn Leu Arg Arg
1 5

10 <210> 212
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 212

Glu Glu Val Asn Leu Arg Arg
1 5

20 <210> 213
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 213

Glu Gly Gly Asn Leu Met Arg
1 5

30 <210> 214
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 214

Glu Lys Ala Asn Leu Thr Arg
1 5

45 <210> 215
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 215

Glu Gln Ala Asn Leu Arg Arg
1 5

55 <210> 216
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 216

His Ser Ser Asn Phe Asn Lys
1 5

<210> 217
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 217

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
1 5

20 <210> 218
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 218

Lys His Ser Asn Leu Ala Arg
1 5

30 <210> 219
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 219

Lys His Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

45 <210> 220
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 220

Lys Lys Thr Asn Leu Thr Arg
1 5

55 <210> 221
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 221

Lys Ser Ser Asn Leu Arg Arg
 1 5

<210> 222
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 222

Gln Ser Phe Asn Leu Arg Arg
 1 5

20 <210> 223
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 223

Arg Glu Asp Asn Leu Gly Arg
 1 5

30 <210> 224
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 224

Arg Gly Asp Asn Leu Lys Arg
 1 5

45 <210> 225
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50 <400> 225

Arg Gly Asp Asn Leu Asn Arg
 1 5

55 <210> 226
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 226

Arg His Asp Gln Leu Thr Arg
1 5

10 <210> 227
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 227

Arg Ile Asp Asn Leu Gly Arg
1 5

20 <210> 228
<211> 7
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 228

Arg Lys Ser Asn Leu Ile Arg
1 5

35 <210> 229
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 229

Arg Met Ser Asn Leu Asp Arg
1 5

45 <210> 230
<211> 7
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 230

55 <210> 231

Arg Asn Thr Asn Leu Thr Arg
1 5

	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 231
10	Arg Pro His Asn Leu Leu Arg 1 5
	<210> 232
	<211> 7
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
20	<400> 232
	Arg Gln Asp Asn Leu Gly Arg 1 5
25	<210> 233
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
30	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 233
35	Arg Gln Asp Asn Leu Gln Arg 1 5
	<210> 234
	<211> 7
	<212> PRT
40	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
45	<400> 234
	Arg Gln Met Asn Leu Asp Arg 1 5
50	<210> 235
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
55	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 235
	Arg Arg Asp Asn Leu Leu Arg 1 5

5 <210> 236
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 236
 10 **Arg Arg Asp Asn Leu Asn Arg**
 1 5
 <210> 237
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 20 <400> 237
Arg Ser Ala Asn Leu Thr Arg
 1 5
 25 <210> 238
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 238
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
 35 1 5
 <210> 239
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 45 <400> 239
Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
 1 5
 50 <210> 240
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 240
Arg Ser Asp Asn Leu Ser Arg
 1 5

<210> 241
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 241
 10
 Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr
 1 5
 <210> 242
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 242
 20
 Arg Ser Asp Asn Leu Thr Arg
 1 5
 <210> 243
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 243
 30
 Arg Ser Asp Asn Leu Val Arg
 1 5
 <210> 244
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 244
 40
 Arg Ser Ser Asn Leu Gln Arg
 1 5
 <210> 245
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 245
 50
 Arg Thr His Asn Leu Lys Arg
 1 5
 <210> 246
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 246
 60
 Arg Thr His Asn Leu Lys Arg
 1 5

5
 <210> 246
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 246

Arg Thr His Asn Leu Thr Arg
1 5

15
 <210> 247
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 247

Arg Val Asp Asn Leu Pro Arg
1 5

25
 <210> 248
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 248

Ser Gly Ser Asn Phe Thr Arg
1 5

35
 <210> 249
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

45
 <400> 249

Thr Asn Asn Asn Leu Ala Arg
1 5

50
 <210> 250
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 250

		Val His Trp Asn Leu Met Arg
		1 5
5	<210> 251	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 251	
		Ile Ser His Asn Leu Ala Arg
		1 5
15	<210> 252	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 252	
		Ile Ser Ser Asn Leu Gln Arg
		1 5
25	<210> 253	
	<211> 7	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
35	<400> 253	
		Leu Gly Asn Asn Leu Lys Arg
		1 5
40	<210> 254	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 254	
		Leu Asn Ser Asn Leu Ala Arg
		1 5
50	<210> 255	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 255	

Leu Ser Thr Asn Leu Thr Arg
1 5

5
 <210> 256
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 256

Leu Thr His Asn Leu Arg Arg
1 5

15
 <210> 257
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 257

Gln Ser Ser Asn Leu Ala Arg
1 5

25
 <210> 258
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35 <400> 258

Arg Ser Asp Ala Leu Ile Gln
1 5

40
 <210> 259
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 259

Ser Lys Gln Ala Leu Ala Val
1 5

50
 <210> 260
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 260

Thr Gly Gln Gln Leu Arg Val
1 5

5 <210> 261
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 261

Thr Lys Gln Arg Leu Val Val
1 5

15 <210> 262
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 262

Thr Arg Gln Arg Leu Arg Ile
1 5

30 <210> 263
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 263

Thr Ser Ala Asn Leu Ser Arg
1 5

40 <210> 264
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 264

50 <210> 265
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 559 361 T3

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 265

Thr Ser Gln Met Leu Val Val
1 5

5

<210> 266

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 266

Thr Ser Ser Asn Leu Ser Arg
1 5

20

<210> 267

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 267

Thr Thr Ser Asn Leu Arg Arg
1 5

30

<210> 268

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 268

40

Val Gly His Asn Leu Ser Arg
1 5

<210> 269

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 269

Val Gly Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

55

<210> 270

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 270

Val Arg His Asn Leu Thr Arg
1 5

10 <210> 271
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 271

Asp Lys Ala Gln Leu Gly Arg
1 5

20 <210> 272
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 272

Asp Arg Ser Ala Leu Ser Arg
1 5

30 <210> 273
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 273

Asp Arg Ser Gln Leu Ala Arg
1 5

45 <210> 274
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 274

Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg
1 5

55 <210> 275
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5
<400> 275

His Asn Gly Thr Leu Lys Arg
1 5

10
<210> 276
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 276

Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val
1 5

20
<210> 277
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30
<400> 277

Leu Lys His Ser Leu Leu Arg
1 5

35
<210> 278
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 278

Leu Asn His Thr Leu Lys Arg
1 5

45
<210> 279
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 279

55
<210> 280

Leu Arg His Ser Leu Ser Arg
1 5

	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 280
10	Gln Asp Asn Thr Leu Arg Arg 1 5
	<210> 281
	<211> 7
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
20	<400> 281
	Gln Asp Val Ser Leu Val Arg 1 5
	<210> 282
25	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
30	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 282
	Gln Gly Gly Thr Leu Arg Arg 1 5
35	<210> 283
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 283
45	Gln Gly Asn Thr Leu Thr Arg 1 5
	<210> 284
	<211> 7
50	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
55	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 284
	Gln Lys Gly Thr Leu Gly Arg 1 5

5
 <210> 285
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 285

Gln Asn Gly Thr Leu Thr Arg
1 5

15
 <210> 286
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 286

Gln Pro Asn Thr Leu Thr Arg
1 5

25
 <210> 287
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 287

Gln Arg Gly Thr Leu Asn Arg
1 5

35
 <210> 288
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 288

Gln Ser Gly Asp Leu Arg Arg
1 5

45
 <210> 289
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 289

55
 <210> 289
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 289

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 290
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 290

Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

15 <210> 291
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 291

Gln Ser Asn Val Leu Ser Arg
1 5

25 <210> 292
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

35 <400> 292

Gln Ser Thr Thr Leu Lys Arg
1 5

40 <210> 293
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 293

Gln Thr Ala Thr Leu Lys Arg
1 5

50 <210> 294
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 294

Gln Thr Asn Thr Leu Lys Arg
1 5

5 <210> 295
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 295

Arg Gly Gln Glu Leu Arg Arg
1 5

15 <210> 296
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 296

Arg Arg Gln Glu Leu His Arg
1 5

30 <210> 297
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 297

Arg Arg Gln Glu Leu Lys Arg
1 5

40 <210> 298
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
50 <400> 298

Arg Arg Gln Glu Leu Thr Arg
1 5

55 <210> 299
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 299

Arg Arg Val Asp Leu Leu Arg
1 5

10 <210> 300
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 300

Ser Pro Glu Gln Leu Ala Arg
1 5

20 <210> 301
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 301

Asp Cys Arg Asp Leu Ala Arg
1 5

30 <210> 302
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 302

Asp Gly Ser Thr Leu Asn Arg
1 5

45 <210> 303
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 303

Asp Gly Ser Thr Leu Arg Arg
1 5

55 <210> 304
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 304

Asp His Ser Asn Leu Ser Arg
1 5

10 <210> 305
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 305

Asp Lys Ser Cys Leu Asn Arg
1 5

20 <210> 306
<211> 7
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 306

Asp Lys Ser Val Leu Ala Arg
1 5

35 <210> 307
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 307

Asp Pro Ser Asn Leu Arg Arg
1 5

45 <210> 308
<211> 7
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 308

55 <210> 309
<211> 7

Asp Pro Ser Thr Leu Arg Arg
1 5

ES 2 559 361 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 309

10

Asp	Arg	Arg	Thr	Leu	Asp	Arg
1				5		

<210> 310
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 310

20

Asp	Arg	Ser	Asp	Leu	Thr	Arg
1				5		

25
 <210> 311
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 311

35

Asp	Arg	Ser	Ser	Leu	Thr	Arg
1				5		

<210> 312
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 312

45

Asp	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Lys
1				5		

<210> 313
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

55
 <400> 313

Asp	Ser	Pro	Thr	Leu	Arg	Arg
1				5		

<210> 314

ES 2 559 361 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 314

Asp Ser Ser Val Leu Arg Arg
 1 5

10

<210> 315
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

20

<400> 315

Glu His Arg Gly Leu Lys Arg
 1 5

25

<210> 316
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 316

Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg
 1 5

35

<210> 317
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 317

45

Glu Arg Arg Gly Leu Ala Arg
 1 5

50

<210> 318
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 318

Glu Arg Arg Gly Leu Asp Arg
1 5

5 <210> 319
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 319

Lys Arg Arg Asp Leu Asp Arg
1 5

15 <210> 320
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 320

Leu Lys Lys Asp Leu Leu Arg
1 5

25 <210> 321
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35 <400> 321

Ser His Thr Val Leu Thr Arg
1 5

40 <210> 322
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 322

Ser Lys Lys Ser Leu Thr Arg
1 5

50 <210> 323
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 323

Ser Asn Lys Asp Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 324
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 324

Val Arg Lys Asp Leu Thr Arg
1 5

15 <210> 325
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 325

Lys Ala Asp Thr Leu Val Arg
1 5

30 <210> 326
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 326

Lys His Asp Thr Leu His Arg
1 5

40 <210> 327
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
50 <400> 327

Lys Asn Asn Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 328
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 328

Arg Ala Asp Thr Leu Arg Arg
1 5

5

<210> 329

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 329

Arg Ala His Thr Leu Arg Arg
1 5

<210> 330

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 330

Arg Glu Asp Ser Leu Pro Arg
1 5

30

<210> 331

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 331

40

Arg His Ala Ala Leu Leu Ser
1 5

<210> 332

<211> 7

45 <212> PRT 4

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50

<400> 332

Arg Lys Asp Gly Leu Thr Arg
1 5

55

<210> 333

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
5	<400> 333	
	Arg Lys Gly Thr Leu Asp Arg	
	1	5
10	<210> 334	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 334	
	Arg Lys Leu Gly Leu Leu Arg	
	1	5
20	<210> 335	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 335	
30	Arg Leu Asp Met Leu Ala Arg	
	1	5
35	<210> 336	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 336	
	Arg Leu Arg Asp Leu Pro Arg	
	1	5
45	<210> 337	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	
	<400> 337	
55	Arg Asn Leu Thr Leu Ala Arg	
	1	5
	<210> 338	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 338

Arg Asn Leu Thr Leu Val Arg
1 5

10 <210> 339
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 339

Arg Pro Asp Gly Leu Ala Arg
1 5

20 <210> 340
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 340

Arg Arg Asp Asp Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 341
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 341

Arg Arg Asp Gly Leu Thr Arg
1 5

45 <210> 342
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 342

Arg Arg His Gly Leu Asp Arg
1 5

55 <210> 343
 <211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 343

Arg Arg His Thr Leu Thr Arg
1 5

10 <210> 344
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 344

20 **Arg Arg Leu Thr Leu Leu Arg**
1 5

<210> 345
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 345

Arg Ser Asp Asp Leu Gln Arg
1 5

35 <210> 346
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 346

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg
1 5

45 <210> 347
<211> 7
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

55 <400> 347

Arg Ser Asp Asp Leu Val Arg
1 5

5
 <210> 348
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 348

Arg Ser Asp Glu Leu Asn Arg
1 5

15
 <210> 349
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 349

Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg
1 5

25
 <210> 350
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 350

Arg Ser Asp Glu Leu Ser Arg
1 5

35
 <210> 351
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

45
 <400> 351

Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg
1 5

50
 <210> 352
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 352

Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg
1 5

5
 <210> 353
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 353

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Lys
1 5

15
 <210> 354
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 354

Arg Ser Asp Thr Leu Lys Lys
1 5

25
 <210> 355
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 355

Arg Ser Asp Val Leu Thr Arg
1 5

40
 <210> 356
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 356

Arg Ser Asn Thr Leu Leu Arg
1 5

50
 <210> 357
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 357

Arg Thr Asp Leu Leu Arg Arg
1 5

5 <210> 358
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 358

Arg Thr Asp Ser Leu Pro Arg
1 5

15 <210> 359
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 359

Arg Thr Asp Thr Leu Ala Arg
1 5

30 <210> 360
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 360

Arg Val Asp Asp Leu Gly Arg
1 5

40 <210> 361
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
50 <400> 361

Ala Arg Ser Thr Arg Thr Thr
1 5

55 <210> 362
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 362

Glu Gly Ser Gly Leu Lys Arg
1 5

5 <210> 363
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 363

Gly Ala Thr Ala Leu Lys Arg
1 5

15 <210> 364
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 364

Lys His Gln Thr Leu Gln Arg
1 5

30 <210> 365
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 365

Leu Lys His Asp Leu Arg Arg
1 5

40 <210> 366
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 366

50 **Leu Arg Ala Ser Leu Arg Arg**
1 5

55 <210> 367
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 367

Leu Arg Gln Thr Leu Ala Arg
1 5

5 <210> 368
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 368

Leu Arg Thr Ser Leu Val Arg
1 5

15 <210> 369
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 369

Met Lys Asn Thr Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 370
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 370

Asn Gly Gln Gly Leu Arg Arg
1 5

40 <210> 371
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 371

50 **Asn Lys Gln Ala Leu Asp Arg**
1 5

55 <210> 372
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 372

Asn Arg Ser Asp Arg Thr Arg
1 5

5 <210> 373
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 373

Gln Arg Gln Ala Leu Asp Arg
1 5

15 <210> 374
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 374

Gln Arg Ser Asp Leu His Arg
1 5

30 <210> 375
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 375

Gln Arg Ser Asp Leu Thr Arg
1 5

40 <210> 376
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 376

50 <210> 377
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 377

Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1 5

5 <210> 378
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 378

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

15 <210> 379
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 379

Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 380
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 380

Thr His Ser Met Leu Ala Arg
1 5

40 <210> 381
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 381

50 **Thr Lys Pro Ile Leu Val Arg**
1 5

<210> 382
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 559 361 T3

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 382

Thr Lys Gln Ile Leu Gly Arg
1 5

5

<210> 383

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 383

Thr Lys Gln Val Leu Asp Arg
1 5

20

<210> 384

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 384

Thr Ser Gly Glu Leu Val Arg
1 5

30

<210> 385

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 385

40

Thr Ser Ser Gly Leu Thr Arg
1 5

<210> 386

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50

<400> 386

Thr Thr Gln Ala Leu Arg Arg
1 5

55

<210> 387

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 387

Val Gly Ala Ser Leu Lys Arg
1 5

10 <210> 388
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 388

Val Gly Asn Ser Leu Thr Arg
1 5

20 <210> 389
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 389

Val Lys Asn Thr Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 390
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 390

Val Arg Gln Gly Leu Thr Arg
1 5

45 <210> 391
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 391

Val Ser Asn Ser Leu Ala Arg
1 5

55 <210> 392
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 392

Val Ser Asn Thr Leu Thr Arg
1 5

10 <210> 393
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 393

Asp Lys Thr Lys Leu Asn Val
1 5

20 <210> 394
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 394

Asp Lys Thr Lys Leu Arg Val
1 5

30 <210> 395
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 395

Asp Asn Ala His Leu Ala Arg
1 5

45 <210> 396
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 396

Gln Ala Asn His Leu Ser Arg
1 5

55 <210> 397
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5

<400> 402

Gln Asn Ser His Leu Arg Arg
1 5

10

<210> 403
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 403

Gln Arg Ala His Leu Glu Arg
1 5

20

<210> 404
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30

<400> 404

Gln Arg Ala His Leu Ile Arg
1 5

35

<210> 405
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 405

Gln Ser Ala His Leu Lys Arg
1 5

45

<210> 406
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 406

55

Gln Ser Gly His Leu Ala Arg
1 5

<210> 407
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

10

<400> 407

Gln Ser Gly His Leu Gln Arg
 1 5

<210> 408
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

20

<400> 408

Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
 1 5

25

<210> 409
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

<400> 409

Gln Ser Gln His Leu Val Arg
 1 5

35

<210> 410
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

45

<400> 410

Gln Ser Thr His Leu Thr Arg
 1 5

50

<210> 411
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

<400> 411

		Gln Thr Thr His Leu Arg Arg
		1 5
5	<210> 412 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 412	
		Gln Thr Thr His Leu Ser Arg
		1 5
15	<210> 413 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 413	
		Gln Thr Thr His Leu Ser Arg
		1 5
25	<210> 414 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 414	
		Gln Val Ser His Leu Thr Arg
		1 5
40	<210> 415 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 415	
		Arg Met Glu Arg Leu Asp Arg
		1 5
50	<210> 416 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 416	

Arg Pro Ala Lys Leu Val Leu
1 5

5
<210> 417
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 417

Arg Pro Ser Lys Leu Val Leu
1 5

15
<210> 418
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 418

Arg Arg Asp His Arg Thr Thr
1 5

25
<210> 419
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
35 <400> 419

Arg Ser Thr His Leu Arg Val
1 5

40
<210> 420
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 420

Arg Thr Asp Arg Leu Ile Arg
1 5

50
<210> 421
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 421

Thr His Ala His Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 422
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 422

Thr Ser Ala His Leu Ala Arg
1 5

15 <210> 423
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 423

Tyr Asn Thr His Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 424
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 424

Ala Lys Ser Lys Leu Asp Arg
1 5

40 <210> 425
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 425

50 <210> 426
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

Ala Pro Ser Lys Leu Asp Arg
1 5

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 426

Asp Gly Gly His Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 427
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 427

Asp Lys Ser His Leu Pro Arg
1 5

15 <210> 428
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 25 <400> 428

Asp Pro Gly His Leu Val Arg
1 5

30 <210> 429
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 429

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
1 5

40 <210> 430
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 430

50 **Asp Arg Ser His Leu Ser Arg**
1 5

55 <210> 431
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 431

Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 432
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 432

Glu Lys Ser His Leu Lys Arg
1 5

15 <210> 433
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 25 <400> 433

Glu Lys Ser His Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 434
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 434

Glu Asn Ser Lys Leu Asn Arg
1 5

40 <210> 435
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 435

50 <210> 436
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 559 361 T3

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 436

Glu Ser Gly His Leu Arg Arg
1 5

5

<210> 437

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 437

Lys Asn His Ser Leu Asn Asn
1 5

20

<210> 438

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 438

Lys Asn Val Ser Leu Thr His
1 5

30

<210> 439

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 439

40

Leu Lys Glu His Leu Thr Arg
1 5

<210> 440

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 440

Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1 5

55

<210> 441

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 441

Ser Lys His Lys Leu Glu Arg
 1 5

10 <210> 442
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 442

Ser Pro Ser Lys Leu Ala Arg
 1 5

20 <210> 443
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 443

Ser Pro Ser Lys Leu Val Arg
 1 5

30 <210> 444
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 444

Thr Asn Ser Lys Leu Thr Arg
 1 5

45 <210> 445
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 445

Thr Pro Ser Lys Leu Asp Arg
 1 5

55 <210> 446
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 446

Thr Arg Ala Lys Leu His Ile
1 5

10 <210> 447
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 447

Val Pro Ser Lys Leu Ala Arg
1 5

20 <210> 448
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 448

Val Pro Ser Lys Leu Lys Arg
1 5

30 <210> 449
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 449

Val Pro Ser Lys Leu Leu Arg
1 5

45 <210> 450
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 450

Lys Gly Asp His Leu Arg Arg
1 5

55 <210> 451
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 451

Lys Lys Asp His Leu His Arg
1 5

10 <210> 452
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 452

Lys Arg Glu Arg Leu Asp Arg
1 5

20 <210> 453
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 453

Lys Arg Glu Arg Leu Glu Arg
1 5

35 <210> 454
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 454

Lys Ser Asn His Leu His Val
1 5

45 <210> 455
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 455

55 <210> 456
<211> 7

Lys Thr Ser His Leu Arg Ala
1 5

ES 2 559 361 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 <400> 456

Arg Gly Asp Lys Leu Ala Leu
1 5

 10
 <210> 457
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 <400> 457

 20

Arg Gly Asp Lys Leu Gly Pro
1 5

 <210> 458
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 30
 <400> 458

Arg Gly Asn His Leu Arg Arg
1 5

 35
 <210> 459
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 <400> 459

Arg Ile Asp Lys Leu Gly Gly
1 5

 45
 <210> 460
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 55
 <400> 460

Arg Lys His His Leu Gly Arg
1 5

5 <210> 461
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 10 <400> 461

Arg Lys His Arg Leu Asp Gly
1 5

 15 <210> 462
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 <400> 462

Arg Asn Asp Lys Leu Val Pro
1 5

 25 <210> 463
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 <400> 463

Arg Asn His Gly Leu Val Arg
1 5

 35 <210> 464
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 45 <400> 464

Arg Asn Thr His Leu Ala Arg
1 5

 50 <210> 465
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

 <400> 465

Arg Gln Gly His Leu Lys Arg
1 5

5 <210> 466
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 466

Arg Arg Ala His Leu Gln Asn
1 5

15 <210> 467
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 467

Arg Arg Glu His Leu Val Arg
1 5

25 <210> 468
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

35 <400> 468

Arg Arg Ser His Leu Thr Arg
1 5

40 <210> 469
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 469

Arg Ser Ala His Leu Ala Arg
1 5

50 <210> 470
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 470

Arg Ser Ala His Leu Ser Arg
1 5

5 <210> 471
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 471

Arg Ser Asp His Leu Ala Arg
1 5

15 <210> 472
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 472

Arg Ser Asp His Leu Ser Lys
1 5

25 <210> 473
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

35 <400> 473

Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

40 <210> 474
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 474

Arg Ser Asp His Leu Thr Arg
1 5

50 <210> 475
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 475

ES 2 559 361 T3

Arg Ser Asp Lys Leu Asn Arg
1 5

5
 <210> 476
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 476

Arg Ser Asp Lys Leu Val Arg
1 5

15
 <210> 477
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 477

Arg Thr Glu His Leu Ala Arg
1 5

25
 <210> 478
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35
 <400> 478

Asp Ser Ser Lys Leu Ser Arg
1 5

40
 <210> 479
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 479

Glu Ala His His Leu Ser Arg
1 5

50
 <210> 480
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 480

His Gly His Arg Leu Lys Thr
1 5

5 <210> 481
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 481

Ile Pro Asn His Leu Ala Arg
1 5

15 <210> 482
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 482

Ile Arg His His Leu Lys Arg
1 5

30 <210> 483
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 483

Leu Thr Gln Gly Leu Arg Arg
1 5

40 <210> 484
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 484

50 **Met Gly His His Leu Lys Arg**
1 5

55 <210> 485
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 485

Met Lys His His Leu Ala Arg
1 5

5 <210> 486
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 486

Met Lys His His Leu Asp Ala
1 5

15 <210> 487
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 487

Met Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

30 <210> 488
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 488

Met Ser His His Leu Ser Arg
1 5

40 <210> 489
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 489

50 **Gln Pro His His Leu Pro Arg**
1 5

<210> 490
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 490

Gln Ser Ser His Leu Ala Arg
1 5

5

<210> 491

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 491

Gln Ser Ser His Leu Thr Arg
1 5

<210> 492

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 492

Arg Gln Ser Arg Leu Gln Arg
1 5

30

<210> 493

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 493

40

Arg Arg Gln Lys Leu Thr Ile
1 5

<210> 494

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50 <400> 494

Arg Arg Ser Arg Leu Val Arg
1 5

55 <210> 495

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 495

5

Arg Ser Asp His Leu Ser Thr
1 5

<210> 496
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 496

Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
1 5

20

<210> 497
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 497

Thr Lys Gln Lys Leu Gln Thr
1 5

30

<210> 498
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40

<400> 498

Thr Lys Gln Arg Leu Glu Val
1 5

45

<210> 499
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 499

Thr Arg Gln Lys Leu Glu Thr
1 5

55

<210> 500
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 500
 5
 Thr Arg Thr Arg Leu Val Ile
 1 5
 <210> 501
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 15 <400> 501
 Thr Ser Gly His Leu Ser Arg
 1 5
 20 <210> 502
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 502
 Thr Ser Gly His Leu Val Arg
 1 5
 30 <210> 503
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 40 <400> 503
 Thr Thr Thr Lys Leu Ala Ile
 1 5
 45 <210> 504
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 50 <400> 504
 Val Asp His His Leu Arg Arg
 1 5
 55 <210> 505
 <211> 7

ES 2 559 361 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 505

10
 Val Lys His Gly Leu Gly Arg
 1 5

15
 <210> 506
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 506

25
 Val Lys His Gly Leu Thr Arg
 1 5

30
 <210> 507
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 507

40
 Trp Pro Ser Asn Leu Thr Arg
 1 5

45
 <210> 508
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 508

55
 Tyr Asn Trp His Leu Gln Arg
 1 5

<210> 509
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 509

Gln Gly Gly Ala Leu Gln Arg
 1 5

<210> 510

	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 510
10	Gln Gly Thr Ser Leu Ala Arg 1 5
	<210> 511
	<211> 7
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
20	<400> 511
	Gln Lys Gln Ala Leu Asp Arg 1 5
25	<210> 512
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
30	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 512
35	Gln Lys Gln Ala Leu Thr Arg 1 5
	<210> 513
	<211> 7
	<212> PRT
40	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
45	<400> 513
	Gln Lys Val Ser Leu Lys Arg 1 5
50	<210> 514
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
55	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 514
	Gln Met Asn Ala Leu Gln Arg 1 5

5 <210> 515
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 515
 10 **Gln Gln Gln Ala Leu Lys Arg**
 1 5
 15 <210> 516
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 20 <400> 516
 25 **Gln Gln Gln Ala Leu Thr Arg**
 1 5
 30 <210> 517
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 517
 35 **Gln Gln Gln Ala Leu Val Arg**
 1 5
 40 <210> 518
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 45 <400> 518
 50 **Gln Gln Ser Ser Leu Leu Arg**
 1 5
 55 <210> 519
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 519

		Gln Arg Ala Ser Leu Thr Arg
		1 5
5	<210> 520 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 520	
		Gln Arg Ser Ser Leu Val Arg
		1 5
15	<210> 521 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 521	
		Gln Ser Gly Ala Leu Ala Arg
		1 5
25	<210> 522 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 522	
		Gln Ser Gly Ala Leu Thr Arg
		1 5
40	<210> 523 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 523	
		Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
		1 5
50	<210> 524 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc	

<400> 524

Gln Ser Gly Thr Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 525
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 525

Gln Ser Ser Ser Leu Ile Arg
1 5

15 <210> 526
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 526

Gln Ser Ser Ser Leu Val Arg
1 5

30 <210> 527
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 527

Gln Ser Ser Thr Leu Thr Arg
1 5

40 <210> 528
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 528

50 **Gln Ser Thr Ser Leu Gln Arg**
1 5

<210> 529
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 559 361 T3

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 529

Thr Ser Ser Ala Arg Thr Thr
1 5

5

<210> 530

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 530

Ala Pro Ser Ser Leu Arg Arg
1 5

<210> 531

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 531

Asp Ala Thr Gln Leu Val Arg
1 5

30

<210> 532

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 532

Asp His Ser Ser Leu Lys Arg
1 5

<210> 533

 $\langle 211 \rangle$ 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50

<400> 533

Asp Pro Gly Ala Leu Val Arg
1 5

55 <210> 534

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 534

Asp Pro Thr Ser Leu Asn Arg
1 5

10 <210> 535
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 535

Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
1 5

20 <210> 536
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 536

Asp Arg Ser Ala Leu Ser Arg
1 5

30 <210> 537
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 537

Asp Arg Ser Ser Leu Arg Arg
1 5

45 <210> 538
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 538

Asp Arg Thr Pro Leu Asn Arg
1 5

55 <210> 539
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 539

Asp Arg Thr Pro Leu Gln Asn
1 5

10 <210> 540
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 540

Asp Arg Thr Ser Leu Ala Arg
1 5

20 <210> 541
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 541

Glu Gly Gly Ala Leu Arg Arg
1 5

30 <210> 542
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 542

Glu Ser Gly Ala Leu Arg Arg
1 5

45 <210> 543
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 543

Asn Thr Ser Leu Leu Arg Arg
1 5

55 <210> 544
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 544

Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
1 5

10 <210> 545
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 545

Thr Gly Ala Val Leu Arg Arg
1 5

20 <210> 546
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 546

Thr Gly Ala Val Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 547
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 547

Thr Lys Lys Ile Leu Thr Val
1 5

45 <210> 548
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 548

Thr Lys Ser Leu Leu Ala Arg
1 5

55 <210> 549
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 549

5

Thr Met Ala Val Leu Arg Arg
1 5

<210> 550

$\langle 211 \rangle$ 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 550

Thr Arg Ala Val Leu Arg Arg
1 5

<210> 551

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 551

Thr Ser Thr Ile Leu Ala Arg
1 5

30

<210> 552

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 552

Thr Ser Thr Leu Leu Lys Arg
1 5

<210> 553

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 553

Thr Ser Thr Leu Leu Asn Arg
1 5

55

<210> 554

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 554
 5
 Arg Ala Ser Val Leu Asp Ile
 1 5
 <210> 555
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 15 <400> 555
 Arg Gly Asp Ala Leu Ala Arg
 1 5
 20 <210> 556
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 556
 Arg His Thr Ser Leu Thr Arg
 30 <210> 557
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 40 <400> 557
 Arg Lys Asp Ala Leu His Val
 1 5
 45 <210> 558
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 558
 Arg Lys His Ile Leu Ile His
 55 <210> 559
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 559

5

Arg Lys Thr Ala Leu Asn Arg
 1 5

<210> 560
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 560

Arg Asn Phe Ile Leu Ala Arg
 1 5

20

<210> 561
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 561

Arg Asn Phe Ile Leu Gln Arg
 1 5

30

<210> 562
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40

<400> 562

Arg Asn Phe Val Leu Ala Arg
 1 5

45

<210> 563
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 563

Arg Asn Thr Ala Leu Gln His
 1 5

55

<210> 564
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 564

Arg Asn Val Ala Leu Gly Asn
1 5

10 <210> 565
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 565

Arg Asn Val Asn Leu Val Thr
1 5

20 <210> 566
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 566

Arg Pro Asp Ala Leu Pro Arg
1 5

30 <210> 567
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 567

Arg Arg Ala Ala Leu Gly Pro
1 5

45 <210> 568
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 568

Arg Arg Glu Val Leu Glu Asn
1 5

55 <210> 569
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<400> 569

Arg Arg Phe Ile Leu Ser Arg
1 5

<213> Secuencia artificial

<400> 570

Arg Arg His Ile Leu Asp Arg
1 5

<213> Secuencia artificial

<400> 571

Arg Ser Ala Ala Leu Ser Arg
1 5

<213> Secuencia artificial

<400> 572

Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1 5

<213> Secuencia artificial

<400> 573

Arg Ser Asp Ala Leu Arg Thr
1 5

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 574

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Arg
1 5

<210> 575
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 575

Arg Ser Asp Ala Leu Thr Arg
1 5

20 <210> 576
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 576

Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
1 5

30 <210> 577
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 577

Arg Ser His Ile Leu Thr Asn
1 5

45 <210> 578
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50 <400> 578

Arg Thr Ser Ser Leu Lys Arg
1 5

55 <210> 579
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 579

Arg Thr Val Ala Leu Asn Arg
1 5

10 <210> 580
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 580

Ser Arg Phe Thr Leu Gly Arg
1 5

20 <210> 581
<211> 7
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30 <400> 581

Ser Arg Phe Thr Leu Gly Arg
1 5

35 <210> 582
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 582

Val Ser Ser Ser Leu Arg Arg
1 5

45 <210> 583
<211> 7
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 583

55 <210> 584

Ala Ala Thr Ala Leu Arg Arg
1 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 584

10

His His Asn Ser Leu Thr Arg
1 5

<210> 585
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

20

<400> 585

His Lys Ser Ser Leu Thr Arg
1 5

25

<210> 586
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 586

His Ser Ser Ser Leu Val Arg
1 5

35

<210> 587
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 587

45

Ile Lys Ala Ile Leu Thr Arg
1 5

<210> 588
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

55

<400> 588

Ile Asn His Ser Leu Arg Arg
1 5

ES 2 559 361 T3

<210> 589
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 589

Ile Arg Thr Ser Leu Lys Arg
1 5

 <210> 590
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 590

Met Asn Ser Val Leu Lys Arg
1 5

 <210> 591
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 591

Met Thr Ser Ser Leu Arg Arg
1 5

 <210> 592
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 592

Gln Ala Thr Leu Leu Arg Arg
1 5

 <210> 593
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 593

Gln Ser Ser Ala Leu Thr Arg
1 5

5
<210> 594
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 594

Thr His Thr Val Leu Ala Arg
1 5

15
<210> 595
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 595

Thr Lys Pro Val Leu Lys Ile
1 5

25
<210> 596
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
35 <400> 596

Thr Asn Gln Ala Leu Gly Val
1 5

40
<210> 597
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 597

Thr Asn Ser Val Leu Gly Arg
1 5

50
<210> 598
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 598

Thr Arg His Ser Leu Gly Arg
1 5

5 <210> 599
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 599

Thr Ser Gly Ala Leu Thr Arg
1 5

15

20 <210> 600
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

25 <400> 600

Thr Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

30 <210> 601
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 601

Thr Ser Gly Ser Leu Val Arg
1 5

40 <210> 602
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50 <400> 602

Thr Ser Thr Leu Leu Lys Arg
1 5

55 <210> 603
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 559 361 T3

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 603

Thr Ser Thr Arg Leu Asp Ile
1 5

5

<210> 604

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 604

Thr Thr Ala Leu Leu Lys Arg
1 5

<210> 605

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 605

Thr Thr Ser Ala Leu Thr Arg
1 5

30

<210> 606

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 606

40

Thr Thr Thr Val Leu Ala Arg
1 5

<210> 607

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

50 <400> 607

Val Gly Gly Ser Leu Asn Arg
1 5

55 <210> 608

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 608

5

Gln Gly Gly Asn Leu Ala Leu
1 5

<210> 609
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 609

Gln Gly Gly Asn Leu Thr Leu
1 5

20

<210> 610
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 610

Gln Gln Gly Asn Leu Gln Leu
1 5

30

<210> 611
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40

<400> 611

Gln Gln Gly Asn Leu Arg Asn
1 5

45

<210> 612
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 612

Gln Arg Gly Asn Leu Asn Met
1 5

55

<210> 613
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 613

5

Gln Ser Gly Asn Leu His Thr
1 5

<210> 614
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 614

Asn Ser Asp His Leu Thr Asn
1 5

20

<210> 615
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 615

Gln Gly Tyr Asn Leu Ala Gly
1 5

30

<210> 616
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40

<400> 616

Arg Ala His Asn Leu Leu Leu
1 5

45

<210> 617
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 617

Arg Glu Asp Asn Leu His Thr
1 5

55

<210> 618
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

$\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 618

Arg Gly His Asn Leu Leu Val
1 5

<210> 619

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 619

Arg Gly Thr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 620

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 620

Arg His Asp Gly Leu Ala Gly
1 5

<210> 621

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 621

Arg Ile Asp His Leu Val Pro
1 5

<210> 622

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 622

Arg Lys Thr Gly Leu Leu Ile
1 5

<210> 623

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 623

5

Arg Leu Asp Gly Leu Ala Gly
1 5

<210> 624
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15

<400> 624

Arg Pro Glu Gly Leu Ser Thr
1 5

20

<210> 625
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 625

Arg Pro Glu Ser Leu Ala Pro
1 5

30

<210> 626
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40

<400> 626

Arg Pro Glu Ser Leu Arg Pro
1 5

45

<210> 627
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 627

Arg Arg Asp Gly Leu Ala Gly
1 5

55

<210> 628
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 628
 5
 Arg Arg Asp His Leu Ser Leu
 1 5
 <210> 629
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 15 <400> 629
 Arg Arg Asp His Leu Ser Pro
 1 5
 20 <210> 630
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 630
 Arg Arg Asp Asn Leu Pro Lys
 1 5
 30 <210> 631
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 40 <400> 631
 Arg Arg Arg Asn Leu Gln Ile
 1 5
 45 <210> 632
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 632
 Arg Ser His Asn Leu Lys Leu
 1 5
 55 <210> 633
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 633

Arg Ser His Asn Leu Arg Leu
 1 5

10 <210> 634
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 634

Thr Ser Ser Asn Arg Lys Lys
 1 5

20 <210> 635
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 635

Gln Ser Ala Asp Arg Thr Lys
 1 5

30 <210> 636
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 636

Asp Lys Arg Ser Leu Pro His
 1 5

45 <210> 637
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 637

Ala Ser Ser Thr Arg Thr Lys
 1 5

55 <210> 638
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5 <400> 638

His Ser Ser Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 639
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

15 <400> 639

Lys Asn Asn Asp Leu Leu Lys
1 5

20 <210> 640
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 640

Asn Arg Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

30

<210> 641
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

40 <400> 641

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Lys
1 5

45 <210> 642
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 642

Arg Ala Asp Gly Leu Gln Leu
1 5

55 <210> 643
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

5

<400> 643

Arg Gly Asp Ser Leu Lys Lys
1 5

10

<210> 644
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 644

Arg Met Asp Ser Leu Gly Gly
1 5

20

<210> 645
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

30

<400> 645

Arg Arg Asp Gly Leu Ser Gly
1 5

35

<210> 646
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 646

Arg Ser Asp Glu Leu Arg Thr
1 5

45

<210> 647
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 647

55

Arg Ser Asp Gly Leu Arg Gly
1 5

<210> 648
<211> 7

ES 2 559 361 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 648

10
 Arg Ser Asp Thr Leu Pro Ala
 1 5

15
 <210> 649
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 649

25
 Arg Ser Asp Thr Leu Pro Leu
 1 5

30
 <210> 650
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 650

40
 Arg Ser Ser Asp Leu Ser Arg
 1 5

45
 <210> 651
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 651

55
 Arg Thr Asp Ser Leu Gln Pro
 1 5

<210> 652
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 652

65
 Asn Asn Arg Asp Arg Thr Lys
 1 5

<210> 653

	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 653
10	Gln Arg Asn Thr Leu Lys Gly 1 5
	<210> 654
	<211> 7
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
20	<400> 654
	Ser Lys Pro Asn Leu Lys Met 1 5
25	<210> 655
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
30	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 655
35	Gln Ala Gly His Leu Ala Ser 1 5
	<210> 656
	<211> 7
	<212> PRT
40	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
	<400> 656
45	Gln Arg Glu His Leu Thr Thr 1 5
	<210> 657
	<211> 7
50	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
55	<400> 657
	Gln Ser Gly His Leu Thr Lys 1 5

<210> 658
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

10

Ala Asn Arg Thr Leu Val His
1 5

<210> 659
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

20

Gln Ala Arg Ser Leu Arg Ala
1 5

<210> 660
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

30

<400> 660

Gln Gly Arg Ser Leu Arg Ala
1 5

35

<210> 661
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

45

<400> 661

Gln Asn Arg Ser Leu Ala His
1 5

<210> 662
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco

55

<400> 662

Gln Gln Arg Ser Leu Lys Asn
1 5

	<210> 663	
	<211> 7	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
10	<400> 663	
		Gln Arg Arg Ser Leu Gly His
		1 5
	<210> 664	
	<211> 7	
15	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
20	<400> 664	
		Arg Ala Arg Asn Leu Thr Leu
		1 5
25	<210> 665	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
	<400> 665	
		Arg Gly Arg Asn Leu Glu Met
35		1 5
	<210> 666	
	<211> 7	
40	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
45	<400> 666	
		Arg Lys Arg Asn Leu Ile Met
		1 5
50	<210> 667	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco	
	<400> 667	
		Arg Met Arg Asn Leu Ile Ile
		1 5

5	<210> 668 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 668 Arg Asn Arg Asn Leu Val Leu 1 5
15	<210> 669 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 669 Arg Arg Arg Asn Leu His Leu 1 5
25	<210> 670 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 670 Arg Arg Arg Asn Leu Thr Leu 1 5
35	<210> 671 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 671 Arg Ser Arg Asn Leu Asp Ile 1 5
45	<210> 672 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 672 Arg Ser Arg Asn Leu Leu Leu 1 5
55	

<210> 673
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 673

Arg Ser Arg Asn Leu Thr Leu
1 5

<210> 674
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 674

Arg Met Asp His Leu Ala Gly
1 5

<210> 675
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 675

Arg Asn Ala His Arg Ile Asn
1 5

<210> 676
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 676

Arg Arg Asp His Leu Ser Leu
1 5

<210> 677
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 677

Arg Arg Glu His Leu Thr Ile
1 5

<210> 678
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 678
 10
 Arg Ser Asp His Leu Arg Glu
 1 5
 <210> 679
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 679
 20
 Arg Ser Asp His Leu Ser Leu
 1 5
 <210> 680
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 680
 30
 Arg Ser Asp His Leu Ser Thr
 1 5
 <210> 681
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 681
 40
 Arg Ser Asp His Leu Thr Thr
 1 5
 <210> 682
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 682
 50
 Arg Thr Glu Ser Leu His Ile
 1 5
 <210> 683
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinco
 <400> 683
 60
 Arg Thr Glu Ser Leu His Ile
 1 5

5	<210> 683 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 683 Lys Arg Gln His Leu Glu Tyr 1 5
15	<210> 684 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 684 Gln Ala His Gly Leu Thr Ala 1 5
25	<210> 685 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 685 Gln Ala His Gly Leu Thr Gly 1 5
35	<210> 686 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 686 Gln Pro Gly His Leu Thr Ala 1 5
45	<210> 687 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc <400> 687 Gln Pro His Gly Leu Ala His 1 5

5
 <210> 688
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 688

Gln Pro His Gly Leu Gly Ala
1 5

15
 <210> 689
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 689

Gln Pro His Gly Leu Arg Ala
1 5

25
 <210> 690
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 690

Gln Pro His Gly Leu Arg His
1 5

35
 <210> 691
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

45
 <400> 691

Gln Gln His Gly Leu Arg His
1 5

50
 <210> 692
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 692

Gln Arg His Gly Leu Ser Ser
1 5

5 <210> 693
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 693

Arg His Gln His Leu Lys Leu
1 5

15 <210> 694
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 694

Arg Lys Gln His Leu Gln Leu
1 5

25 <210> 695
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35 <400> 695

Arg Lys Gln His Leu Thr Leu
1 5

40 <210> 696
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 696

Arg Lys Gln His Leu Val Leu
1 5

50 <210> 697
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 697

Arg Arg Gln Ala Leu Glu Tyr
1 5

5
 <210> 698
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 698

Arg Arg Gln His Leu Gln Tyr
1 5

15
 <210> 699
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 699

Gln Gln Thr Gly Leu Asn Val
1 5

25
 <210> 700
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 35
 <400> 700

Gln Arg Asn Ala Leu Arg Gly
1 5

40
 <210> 701
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
 <400> 701

Arg Ala Asn His Leu Thr Ile
1 5

50
 <210> 702
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc

<400> 702

Arg Ala Asp Ala Leu Met Val
1 5

5 <210> 703
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 703

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Ala
1 5

15 <210> 704
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
25 <400> 704

His Ser Asn Ala Arg Lys Thr
1 5

30 <210> 705
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> hélices de reconocimiento para cada uno de los sitios de unión al triplete de dedo de cinc
<400> 705

Gln Arg Asn Ala Leu Ser Gly
1 5

40 <210> 706
<211> 23
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55 <400> 706

Cys Arg Cys Asn Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

<210> 707

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 707

Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Thr Lys Ile His
20

<210> 708

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 708

Phe Ala Cys Glu Val Cys Gly Val Arg Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Met Arg Lys His
20

<210> 709

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(20)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 709

Phe Ala Cys Ser Trp Gln Asp Cys Asn Lys Lys Phe Ala Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr Arg Thr His
20 25

5 <210> 710

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 710

Phe Glu Cys Lys Asp Cys Gly Lys Ala Phe Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

20

<210> 711

<211> 23

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 711

Phe His Cys Gly Tyr Cys Glu Lys Ser Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Ile Arg Thr His
20

40 <210> 712

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 712

5

Phe Lys Cys Pro Val Cys Gly Lys Ala Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

<210> 713

<211> 24

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

20

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 713

Phe Leu Cys Gln Tyr Cys Ala Gln Arg Phe Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Met Lys Lys Ser His
20

25

<210> 714

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 714

Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Thr Arg Thr His
20

40

<210> 715

<211> 23

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 715

 Phe Gln Cys Asn Gln Cys Gly Ala Ser Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa His Ile Lys Leu His
 20
 10
 <210> 716
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (14)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 716
 25
 Phe Ser Cys Ser Trp Lys Gly Cys Glu Arg Arg Phe Ala Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Xaa Xaa His Arg Arg Thr His
 20 25

 <210> 717
 <211> 28
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 40
 <400> 717

 Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Arg Thr His
 20 25
 45
 <210> 718
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <400> 718

His Lys Cys Leu Glu Cys Gly Lys Cys Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

15 <210> 719
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 719

Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Lys Phe Ala
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Thr Lys Ile His
20 25

30 <210> 720
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 720

Pro Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Lys Thr His
20 25

45 <210> 721
 <211> 28

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 721

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Glu	Cys	Lys	Asp	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Ile
1				5					10					15	

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Gln	Arg	Thr	His
			20						25			

15 <210> 722
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
25 <221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 722

30

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Lys	Cys	Pro	Val	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Arg
1				5					10					15	

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Gln	Arg	Thr	His
			20						25			

<210> 723
35 <211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(25)
45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 723

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Met	Cys	Thr	Trp	Ser	Tyr	Cys	Gly	Lys	Arg
1				5					10					15	

Phe	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Lys	Arg	Thr	His
			20						25				30

<210> 724
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <400> 724
 15
 Pro Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Thr Arg Thr His
 20 25
 <210> 725
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30
 <400> 725
 Pro Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Asn Gln Cys Gly Ala Ser Phe Thr
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Lys Leu His
 20 25
 35
 <210> 726
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(25)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 45
 <400> 726

Pro Gly Glu Lys Pro His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys Val
1 5 10 15

Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Leu Arg Trp His
20 25 30

<210> 727

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 727

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ala Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Arg Arg Ile His
20 25

<210> 728

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 728

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ser Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Arg Thr His
20 25

<210> 729

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 729

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Glu Lys Cys Gly Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Lys Ser His
20 25

5 <210> 730
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 730

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys His Asp Cys Gly Lys Ser Phe Arg
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Arg Arg Ile His
20 25

20 <210> 731
<211> 28
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 731

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Lys Glu Cys Gly Lys Ala Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Ile His
20 25

40 <210> 732
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 732

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Asn Tyr Cys Gly Lys Thr Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Ile His
20 25

10 <210> 733
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 733

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Gly Cys His Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Glu Met Ile His
20 25

25 <210> 734
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 734

40 **Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Ile Cys Arg Lys Cys Gly Arg Gly Phe Ser**
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20 25

45 <210> 735
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 735

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Ile Val His
20 25

<210> 736

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 736

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Arg
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Ile Ile His
20 25

<210> 737

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 737

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Thr
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Lys Ile His
20 25

<210> 738

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 559 361 T3

<220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <400> 738

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Cys	Gly	Gln	Cys	Gly	Lys	Phe	Tyr	Ser
1				5					10					15	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Gln	Lys	Ile	His			
				20					25						

<210> 739
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <400> 739

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Cys	His	Gln	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Ile
1				5					10					15	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Glu	Arg	Thr	His			
				20					25						

30 <210> 740
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 740

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Cys	Lys	Glu	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Asn
1				5					10					15	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	His	Arg	Ile	His			
				20					25						

45 <210> 741
 <211> 28
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 741

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Lys Glu Cys Gly Gln Ala Phe Arg

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His His Lys Leu His

20 25

15

<210> 742

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

25

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 742

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Lys Gln Cys Gly Lys Ala Phe Gly

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gly Arg Thr His

20 25

30

<210> 743

<211> 28

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<400> 743

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Met Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Ile His
20 25

<210> 744

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 744

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Asp Cys Gly Lys Ser Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20 25

<210> 745

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 745

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20 25

<210> 746

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 746

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Ser Glu Cys Gly Arg Gly Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20 25

5 <210> 747

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 747

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Arg Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Arg
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Arg Ile His
20 25

20

<210> 748

<211> 29

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 748

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Arg Cys Lys Tyr Cys Asp Arg Ser Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Val Arg Asn Ile His
20 25

40 <210> 749

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 749

5

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Lys Gln Cys Gly Lys Ala Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Glu Thr Thr His
20 25

<210> 750

<211> 28

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<400> 750

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Ser Asp Cys Gly Lys Ala Phe Arg
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Arg Arg Thr His
20 25

25

<210> 751

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (19)..(25)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 751

Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys Asp Val Glu Gly Cys Thr Trp Lys
1 5 10 15

Phe Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Lys Arg His
20 25 30

40

<210> 752

<211> 28

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

50

<220>

<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 752

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Val	Cys	Arg	Glu	Cys	Gly	Arg	Gly	Phe	Arg
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Lys	Arg	Thr	His				
			20					25							

10 <210> 753
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 753

Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Val	Cys	Ser	Lys	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Gln	Lys	Ile	His				
			20					25							

25 <210> 754
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(25)
35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 754

Pro	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Met	Cys	Thr	Trp	Ser	Tyr	Cys	Gly	Lys	Arg
1				5					10					15	
Phe	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Lys	Arg	Thr	His		
			20					25					30		

45 <210> 755
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

```
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (17)..(23)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 755

Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Cys	Gly	Lys	Lys	Phe	Ala
1				5					10					15	

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Thr Lys Ile His
20 25

<210> 756
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 756

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Lys Lys Phe Ala
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Thr Lys Ile His
20 25

<210> 757
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 757

Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Phe	Gln	Cys	Arg	Ile	Cys	Met	Arg	Asn	Phe	Ser
1				5					10					15	

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Arg Thr His
20 25

<210> 758
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(24)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 758

Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
1 5 10 15

Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Arg Thr His
20 25

<210> 759
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 759

Val Pro Glu Arg Pro Phe Gln Cys Gln Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Arg Thr His
20 25

<210> 760
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 760

Tyr Ala Cys His Leu Cys Ala Lys Ala Phe Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Glu Lys Thr His
20

<210> 761
<211> 23
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

5

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 761

Tyr Ala Cys His Leu Cys Gly Lys Ala Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Glu Lys Thr His
20

15

<210> 762
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<400> 762

Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ala Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Arg Arg Ile His
20

30

<210> 763
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<400> 763

Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ser Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Arg Thr His
20

<210> 764
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

```
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (12)..(18)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 764

Tyr Glu Cys Asp Val Cys Gly Lys Thr Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

<210> 765
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 765

Tyr Glu Cys Glu Lys Cys Gly Lys Ala Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Lys Ser His
20

<210> 766
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 766

Tyr Glu Cys His Asp Cys Gly Lys Ser Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Arg Arg Ile His
20

<210> 767

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 767

Tyr Glu Cys Lys Glu Cys Gly Lys Ala Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Ile His
20

<210> 768

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 768

Tyr Glu Cys Asn Glu Cys Gly Lys Ala Phe Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Ile His
20

<210> 769

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 769

Tyr Glu Cys Asn Glu Cys Gly Lys Phe Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Arg Arg Ser His
20

5 <210> 770

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 770

Tyr Glu Cys Asn Thr Cys Arg Lys Thr Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

20

<210> 771

<211> 23

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 771

Tyr Glu Cys Gln Asp Cys Gly Arg Ala Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Arg Thr His
20

40 <210> 772

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 772

5

Tyr Glu Cys Val Gln Cys Gly Lys Gly Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Val His
20

<210> 773

<211> 23

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<400> 773

Tyr Glu Cys Val Gln Cys Gly Lys Ser Tyr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Arg His
20

25

<210> 774

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 774

Tyr Gly Cys His Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Glu Met Ile His
20

40

<210> 775

<211> 25

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento


```
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (14)..(20)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 775

Tyr His Cys Asp Trp Asp Gly Cys Gly Trp Lys Phe Ala Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr Arg Lys His
20 25

<210> 776
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 776

Tyr Ile Cys Arg Lys Cys Gly Arg Gly Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

<210> 777
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

```
<220>  
<221> misc_feature  
<222> (12)..(18)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
```

<400> 777

Tyr Lys Cys Asp Glu Cys Gly Lys Asn Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Arg Ile His
20

<210> 778
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 778

Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Ile Val His
20

<210> 779

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 779

Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Ile Ile His
20

<210> 780

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 780

Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Lys Ile His
20

<210> 781

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <400> 781

Tyr Lys Cys Gly Gln Cys Gly Lys Phe Tyr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Lys Ile His
20

<210> 782
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <400> 782

Tyr Lys Cys His Gln Cys Gly Lys Ala Phe Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Glu Arg Thr His
20

30 <210> 783
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 783

Tyr Lys Cys Lys Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His His Arg Ile His
20

45 <210> 784
 <211> 23
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10
<400> 784

Tyr Lys Cys Lys Glu Cys Gly Gln Ala Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His His Lys Leu His
20

15
<210> 785
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
<221> misc_feature
25
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 785

Tyr Lys Cys Lys Gln Cys Gly Lys Ala Phe Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gly Arg Thr His
20

30
<210> 786
<211> 23
<212> PRT
35
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

40
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45
<400> 786

Tyr Lys Cys Met Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Ile His
20

ES 2 559 361 T3

<210> 787
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 787
 Tyr Lys Cys Pro Asp Cys Gly Lys Ser Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
 20
 <210> 788
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 788
 Tyr Met Cys Ser Glu Cys Gly Arg Gly Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
 20
 <210> 789
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 789

Tyr Gln Cys Asn Ile Cys Gly Lys Cys Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
20

<210> 790

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 790

Tyr Arg Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Lys Arg Ile His
20

<210> 791

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 791

Tyr Arg Cys Lys Tyr Cys Asp Arg Ser Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Val Arg Asn Ile His
20

<210> 792

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(20)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 792

Tyr Arg Cys Ser Trp Glu Gly Cys Glu Trp Arg Phe Ala Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa His Phe Arg Lys His
20 25

5 <210> 793
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 793

Tyr Ser Cys Gly Ile Cys Gly Lys Ser Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Cys Ile Leu His
20

20 <210> 794
 <211> 23
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 794

Tyr Thr Cys Lys Gln Cys Gly Lys Ala Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Glu Thr Thr His
20

40 <210> 795
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
 <221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 795

5

Tyr Thr Cys Ser Asp Cys Gly Lys Ala Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Arg Arg Thr His
20

<210> 796

<211> 23

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<400> 796

Tyr Thr Cys Ser Tyr Cys Gly Lys Ser Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa His Thr Arg Ile His
20

25

<210> 797

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (14)..(20)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 797

Tyr Val Cys Asp Val Glu Gly Cys Thr Trp Lys Phe Ala Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa His Lys Lys Arg His
20 25

40

<210> 798

<211> 23

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <400> 798

 Tyr Val Cys Arg Glu Cys Gly Arg Gly Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa His Lys Arg Thr His
 20
 10
 <210> 799
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento

 <220>
 <221> misc_feature
 20
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 799

 Tyr Val Cys Arg Glu Cys Arg Arg Gly Phe Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa His Gln Arg Thr His
 20
 25
 <210> 800
 <211> 23
 <212> PRT
 30
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> las regiones conservadas de la proteína de dedo de cinc con inserto para la hélice de reconocimiento
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 40
 <400> 800

 Tyr Val Cys Ser Lys Cys Gly Lys Ala Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa His Gln Lys Ile His
 20
 45
 <210> 801
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> sitio de reconocimiento de ablación
 <400> 801
 5 ggtcgatggt cgcaacgtcg atcgtagctg ca 32
 <210> 802
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de ablación
 <400> 802
 15 ggtcggcgac gcgaatcgtc gattggcgta c 31
 <210> 803
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de ablación
 25 <400> 803
 actattcgca cgccgtacga tagtcggcgc ga 32
 <210> 804
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de ablación
 35 <400> 804
 ggtcggcgac gcgtatcgat tggcgtac 28
 <210> 805
 40 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> espaciador enlazador
 <400> 805
 Gly Thr Ser Gly Lys
 1 5
 50
 <210> 806
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> una secuencia de 32 pb para el sitio de reconocimiento de ablación
 <400> 806
 60 ggtcgatggt cgcaacgtcg atcgtagctg ca 32
 <210> 807
 <211> 28
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia conservada para el módulo del dedo de cinc

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <400> 807

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Leu Arg Thr His
20 25

15 <210> 808
 <211> 1443
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> enzima FokI_Cat modificada

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1443)

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(594)
 <223> Dominio catalítico de FokI

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (595)..(606)
 <223> enlazador de 4 aminoácidos

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (607)..(687)
 <223> dedo de cinc N1

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (688)..(771)
 <223> dedo de cinc N2

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (772)..(855)
 <223> dedo de cinc N3

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (856)..(939)
 <223> dedo de cinc N4

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (940)..(1023)
 <223> dedo de cinc N5

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1024)..(1107)
5	<223> dedo de cinc N6
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1108)..(1191)
10	<223> dedo de cinc N7
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1192)..(1275)
15	<223> dedo de cinc N8
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1276)..(1359)
20	<223> dedo de cinc N9
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1360)..(1443)
25	<223> dedo de cinc N10
	<400> 808

atg aag cag ctg gtg aaa agc gag ctg gaa gag aag aag tcc gag ctg	48
Met Lys Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu	
1 5 10 15	
cgg cac aag ctg aaa tac gtg ccc cac gag tac atc gag ctg atc gag	96
Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu	
20 25 30	
atc gcc cgg aac ccc acc cag gac aga atc ctg gaa atg aag gtc atg	144
Ile Ala Arg Asn Pro Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met	
35 40 45	
gaa ttt ttc atg aag gtg tac ggc tac cgg ggc gag cac ctg ggc ggc	192
Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Glu His Leu Gly Gly	
50 55 60	
agc aga aaa ccc gac ggc gcc atc tac acc gtg ggc agc ccc atc gac	240
Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp	
65 70 75 80	
tac ggc gtg atc gtg gac acc aag gcc tac agc ggc ggc tac aac ctg	288
Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu	
85 90 95	
ccc atc gga cag gcc gac gag atg cag aga tac gtg gaa gag aac cag	336
Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln	
100 105 110	
acc cgg aac aag cac atc aac ccc aac gag tgg tgg aag gtg tac ccc	384
Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro	
115 120 125	
agc agc gtg acc gag ttc aag ttc ctg ttc gtg tcc ggc cac ttc aag	432
Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys	
130 135 140	
ggc aac tac aag gcc cag ctg acc cgg ctg aac cac atc acc aac tgc	480
Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys	
145 150 155 160	
aac ggc gct gtg ctg agc gtg gaa gaa ctg ctg atc ggc ggc gag atg	528
Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met	
165 170 175	
atc aag gcc ggc acc ctg acc ctg gaa gaa gtg cgg cgg aag ttc aac	576
Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn	
180 185 190	

aac ggc gag atc aac ttc ggc act agt ggc ggc gag aag ccc tac aag Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Thr Ser Gly Gly Glu Lys Pro Tyr Lys 195 200 205	624
tgc cct gag tgc ggc aag agc ttc agc cag aga aga agc ctg ggc cac Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Arg Arg Ser Leu Gly His 210 215 220	672
cac cag cgt acg cac ccc ggc gag aaa cct tat aag tgt ccc gaa tgt His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys 225 230 235 240	720
ggc aag tcc ttc agc aag aag aac gac ctg acc cgg cac cag cgg aca Gly Lys Ser Phe Ser Lys Lys Asn Asp Leu Thr Arg His Gln Arg Thr 245 250 255	768
cac ccc ggg gaa aag cca tac aaa tgt cca gag tgt ggg aag tct ttc His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe 260 265 270	816
tcc agc cgg cgg acc tgc aga gcc cat cag aga aca cat acc ggg gag Ser Ser Arg Arg Thr Cys Arg Ala His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu 275 280 285	864
aag cct ttc cag tgc cgg atc tgc atg aga aac ttc agc gtg cgg cac Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Val Arg His 290 295 300	912
aac ctg acc aga cac ctg agg acc cat acc ggc gaa aaa ccc ttt cag Asn Leu Thr Arg His Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln 305 310 315 320	960
tgc aga atc tgt atg cgg aac ttc tcc gac cgg acc agc ctg gcc cgg Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Asp Arg Thr Ser Leu Ala Arg 325 330 335	1008
cat ctg aga act cat cct ggg gaa aag ccc tat aag tgt cca gaa tgc His Leu Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys 340 345 350	1056
ggg aaa tcc ttt agc gac agc ggc aac ctg cgg gtg cac cag agg act Gly Lys Ser Phe Ser Asp Ser Gly Asn Leu Arg Val His Gln Arg Thr 355 360 365	1104
cat cca ggc gag aaa ccc tac aaa tgc ccc gaa tgc gga aag tca ttc His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe 370 375 380	1152
tcc cac acc ggc cat ctg ctc gag cat cag cgg acc cac act ggg gag Ser His Thr Gly His Leu Leu Glu His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu 385 390 395 400	1200
aaa cca ttt cag tgt cgc atc tgt atg agg aat ttc agc acc aac cag Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Thr Asn Gln 405 410 415	1248
gcc ctg ggc gtg cac ctg aga aca cac cca ggc gag aag cct tac aag Ala Leu Gly Val His Leu Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys 420 425 430	1296
tgt cca gag tgc gga aag tca ttt tcc gtg cgc cac aat ctg aca cgg Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Val Arg His Asn Leu Thr Arg	1344

435	440	445	
cat cag cgc acc cat ccc ggc gag aag cct tac aaa tgc ccc gag tgt			1392
His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys			
450	455	460	
ggc aaa tct ttc agt gac cgg acc tct ctg gcc aga cat cag agg aca			1440
Gly Lys Ser Phe Ser Asp Arg Thr Ser Leu Ala Arg His Gln Arg Thr			
465	470	475	480
cac			1443
His			

<210> 809

<211> 481

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 809

Met	Lys	Gln	Leu	Val	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu
1				5					10					15	

Arg	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Val	Pro	His	Glu	Tyr	Ile	Glu	Leu	Ile	Glu
		20						25					30		

Ile	Ala	Arg	Asn	Pro	Thr	Gln	Asp	Arg	Ile	Leu	Glu	Met	Lys	Val	Met
	35						40					45			

Glu	Phe	Phe	Met	Lys	Val	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Glu	His	Leu	Gly	Gly
50						55					60				

Ser	Arg	Lys	Pro	Asp	Gly	Ala	Ile	Tyr	Thr	Val	Gly	Ser	Pro	Ile	Asp
65				70						75				80	

Tyr	Gly	Val	Ile	Val	Asp	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ser	Gly	Gly	Tyr	Asn	Leu
			85						90					95	

Pro	Ile	Gly	Gln	Ala	Asp	Glu	Met	Gln	Arg	Tyr	Val	Glu	Glu	Asn	Gln
		100						105					110		

Thr	Arg	Asn	Lys	His	Ile	Asn	Pro	Asn	Glu	Trp	Trp	Lys	Val	Tyr	Pro
		115					120					125			

Ser	Ser	Val	Thr	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	His	Phe	Lys
	130					135				140					

Gly	Asn	Tyr	Lys	Ala	Gln	Leu	Thr	Arg	Leu	Asn	His	Ile	Thr	Asn	Cys
145					150					155				160	

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

405 410 415

Ala Leu Gly Val His Leu Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys
420 425 430

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Val Arg His Asn Leu Thr Arg
435 440 445

His Gln Arg Thr His Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys
450 455 460

Gly Lys Ser Phe Ser Asp Arg Thr Ser Leu Ala Arg His Gln Arg Thr
465 470 475 480

His

5 <210> 810
<211> 2991
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> expresión del gen indicador del plásmido

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(832)
<223> Potenciador y promotor I.E. de CMV

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (833)..(1029)
<223> Intrón Promega

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1077)..(1082)
<223> Secuencia Kozak

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1083)..(2732)
<223> Luciferasa

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (2752)..(2991)
<223> poli A de SV40

<400> 810

taggaagatc ttcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc 60

aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata ataatatgta catttatatt 120

gggtcatgtc caatatgacc gccatgttgg cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 180

tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	240
gtaaattggcc	cgcttggtg	accgccaac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	300
tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	360
cggtaaactg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtcc	gccccctatt	420
gacgtcaatg	acggtaaatg	gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttacgggac	480
tttcctactt	ggcagtacat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggg	gatgcggttt	540
tggcagtaca	ccaatgggcg	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	600
cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttgg	cacccaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	660
cgtaataacc	ccgccccgtt	gacgcaaag	ggcggtaggc	gtgtacgggtg	ggaggtctat	720
ataagcagag	ctcgtttagt	gaaccgtcag	atcactagaa	gctttattgc	ggtagtttat	780
cacagttaaa	ttgctaacgc	agtcagtgtc	tctgacacaa	cagtctcgaa	cttaagctgc	840
agaagttggt	cgtgaggcac	tgggcaggta	agtatcaagg	ttacaagaca	ggtttaagga	900
gaccaataga	aactgggctt	gtcgagacag	agaagactct	tgcgtttctg	ataggcacct	960
attggtctta	ctgacatcca	ctttgccttt	ctctccacag	gtgtccactc	ccagttcaat	1020
tacagctctt	aaggctagag	tacttaatac	gactcactat	aggctagcgc	gatcgcgcca	1080
ccatggaaga	tgccaaaaac	attaagaagg	gcccagcgcc	attctaccca	ctcgaagacg	1140
ggaccgccgg	cgagcagctg	cacaaagcca	tgaagcgcta	cgccctgggtg	ccgggcacca	1200
tgccttttac	cgacgcacat	atcgaggtgg	acattaccta	cgccgagtac	ttcgagatga	1260
gcgttcggct	ggcagaagct	atgaagcgct	atgggctgaa	tacaaaccat	cggatcgtgg	1320
tgtgcagcga	gaatagcttg	cagttcttca	tgcccggtgt	gggtgccttg	ttcatcggtg	1380
tggctgtggc	cccagctaac	gacatctaca	acgagcgcca	gctgctgaac	agcatgggca	1440
tcagccagcc	cacogtcgta	ttcgtgagca	agaaagggtc	gcaaaagatc	ctcaacgtgc	1500
aaaagaagct	accgatcata	caaagatca	tcatcatgga	tagcaagacc	gactaccagg	1560
gcttccaaag	catgtacacc	ttcgtgactt	cccatttgcc	acccggcttc	aacgagtacg	1620
acttcgtgcc	cgagagcttc	gaccgggaca	aaaccatcgc	cctgatcatg	aacagtagtg	1680
gcagtaccgg	attgoccaaag	ggcgtagccc	taccgcaccg	caccgcttgt	gtccgattca	1740
gtcatgcccg	cgaccccatc	ttcggcaacc	agatcatccc	cgacaccgct	atctcagcg	1800
tggtgccatt	tcaccacggc	ttcggcatgt	tcaccacgct	gggctacttg	atctgcccgt	1860
ttcgggtcgt	gctcatgtac	cgcttcgagg	aggagctatt	cttgccgcagc	ttgcaagact	1920
ataagattca	atctgccttg	ctgggtccca	cactatttag	cttcttcgct	aagagcactc	1980
tcatcgacaa	gtacgaccta	agcaacttgc	acgagatcgc	cagcggcggg	gcgcgctca	2040

gcaaggaggt aggtgaggcc gtggccaaac gcttccacct accaggcatc cgccagggct 2100
acggcctgac agaaacaacc agcgccattc tgatcacccc cgaaggggac gacaagcctg 2160
gcgcagtagg caaggtggtg cccttcttcg aggctaaggt ggtggacttg gacaccggtg 2220
agacactggg tgtgaaccag cgcggcgagc tgtgcgtccg tggcccatg atcatgagcg 2280
gctacgttaa caaccccgag gctacaaacg ctctcatcga caaggacggc tggctgcaca 2340
gcggcgacat cgcctactgg gacgaggacg agcacttctt catcgtggac cggctgaaga 2400
gcctgatcaa atacaagggc taccaggtag cccagccga actggagagc atcctgctgc 2460
aacaccccaa catcttcgac gccgggggtc cgggcctgcc cgacgacgat gccggcgagc 2520
tgcccgcgcg agtcgtcgtg ctggaacacg gtaaaacat gaccgagaag gagatcgtgg 2580
actatgtggc cagccagggtt acaaccgcca agaagctgcg cgggtggtgtt gtgttcgtgg 2640
acgaggtgcc taaaggactg accggcaagt tggacgcccg caagatccgc gagattctca 2700
ttaaggccaa gaaggcgggc aagatcgccg tgtaataagc atgcaagctt gccggcgctt 2760
cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 2820
aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 2880
tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag 2940
atgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat gtggtaaaat c 2991

<210> 811

<211> 3061

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> expresión del gen indicador del plásmido

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(832)

<223> Potenciador y promotor I.E. de CMV

<220>

<221> misc_feature

<222> (833)..(1029)

<223> Intrón Promega

<220>

<221> misc_feature

<222> (1069)..(1100)

<223> secuencia de 32 pb en orientación directa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1101)..(1106)

<223> espaciador

<220>

<221> misc_feature

<222> (1107)..(1138)

<223> secuencia de 32 pb en orientación inversa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1147)..(1152)
 <223> Secuencia Kozak

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1153)..(2802)
 <223> Luciferasa

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2822)..(3061)
 <223> Poli A de SV40

15

<400> 811

taggaagatc ttcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc	60
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc ataatatgta catttatatt	120
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttgg cattgattat tgactagtta ttaatagtaa	180
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttaog	240
gtaaatggcc cgcctggctg accgccaac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg	300
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta	360
cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gcccctatt	420
gacgtcaatg acggtaaatg gccgcctgg cattatgcc agtacatgac cttacgggac	480
tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt	540
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac	600
cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt	660
cgtaataacc ccgcccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat	720
ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcactagaa gctttattgc ggtagtttat	780
cacagttaaa ttgctaacgc agtcagtgtc tctgacacaa cagtctcgaa cttaaagctgc	840
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga	900
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct	960
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat	1020
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcgg tcgatgttcg	1080
caacgtcgat cgtacgtgca acgcttgca cgtacgatcg acgttgcgaa catcgaccgc	1140
gatcgcgccca ccatggaaga tgccaaaaac attaagaagg gccagcgcc attctacca	1200
ctcgaagacg ggaccgccgg cgagcagctg caciaagcca tgaagcgcta cgcctggtg	1260
ccgggcacca tcgcctttac cgacgcacat atcgaggtgg acattaccta cgcgagtac	1320

```

ttcgagatga gcggttcggct ggcagaagct atgaagcgct atgggctgaa tacaaaccat 1380
cggatcgtgg tgtgcagcga gaatagcttg cagttcttca tgcccgtgtt ggggtgccctg 1440
ttcatcggtg tggctgtggc cccagctaac gacatctaca acgagcgcgga gctgctgaac 1500
agcatgggca tcagccagcc caccgtcgta ttcgtgagca agaaagggct gcaaaagatc 1560
ctcaacgtgc aaaagaagct accgatcata caaaagatca tcatcatgga tagcaagacc 1620
gactaccagg gcttccaaag catgtacacc ttcgtgactt cccatttgcc acccggttc 1680
aacgagtacg acttcgtgcc cgagagcttc gaccgggaca aaaccatcgc cctgatcatg 1740
aacagtagtg gcagtaccgg attgccaag ggcgtagccc taccgcaccg caccgcttgt 1800
gtccgattca gtcatgcccg cgaccccatc ttoggcaacc agatcatccc cgacaccgct 1860
atcctcagcg tgggtgccatt tcaccacggc ttoggcatgt tcaccacgct gggctacttg 1920
atctgcggct ttccgggtcgt gctcatgtac cgcttcgagg aggagctatt cttgcgcagc 1980
ttgcaagact ataagattca atctgccctg ctgggtgccca cactatttag cttcttcgct 2040
aagagcactc tcatcgacaa gtacgaccta agcaacttgc acgagatcgc cagcggcggg 2100
gcgccgctca gcaaggaggt aggtgaggcc gtggccaaac gcttccacct accaggcatc 2160
cgccagggtc acggcctgac agaaacaacc agcgccattc tgatcacccc cgaaggggac 2220
gacaagcctg gcgcagtagg caaggtggtg cccttcttcg aggctaaggt ggtggacttg 2280
gacaccggta agacactggg tgtgaaccag cgcggcgagc tgtgcgtccg tggcccatg 2340
atcatgagcg gctacgttaa caaccccgag gctacaaacg ctctcatcga caaggacggc 2400
tggctgcaca gcggcgacat cgctactggg gacgaggacg agcacttctt catcgtggac 2460
cggctgaaga gcctgatcaa atacaagggc taccaggtag cccagccga actggagagc 2520
atcctgctgc aacaccccaa catcttcgac gccggggtcg ccggcctgcc cgacgacgat 2580
gccggcgagc tgcccgcgc agtcgtcgtg ctggaacacg gtaaaaccat gaccgagaag 2640
gagatcgtgg actatgtggc cagccagggt acaaccgcca agaagctgcg cggtggtgtt 2700
gtgttcgtgg acgaggtgcc taaaggactg accggcaagt tggacgcccg caagatccgc 2760
gagattctca ttaaggccaa gaaggcggc aagatcgccg tgtaataagc atgcaagctt 2820
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 2880
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 2940
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3000
tcagggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3060
c 3061

```

<211> 3131

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> expresión del gen indicador del plásmido

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(832)
 <223> Potenciador y promotor I.E. de CMV

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (833)..(1029)
 <223> Intrón Promega

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1069)..(1100)
 <223> secuencia de 32 pb en orientación directa

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1101)..(1106)
 <223> espaciador

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1107)..(1138)
 <223> secuencia de 32 pb en orientación inversa

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1147)..(1152)
 <223> Secuencia Kozak

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1153)..(2802)
 <223> Luciferasa

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2815)..(2846)
 <223> secuencia de 32 pb en orientación directa

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2847)..(2852)
 <223> espaciador

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2853)..(2884)
 <223> secuencia de 32 pb en orientación inversa

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2893)..(3131)
 <223> Poli A de SV40

<400> 812

taggaagatc	ttcaatattg	gccattagcc	atattattca	ttggttatat	agcataaate	60
aatattggct	attggccatt	gcatacgttg	tatctatata	ataatatgta	catttatatt	120
ggctcatgtc	caatatgacc	gocatgttgg	cattgattat	tgactagtta	ttaatagtaa	180
tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttaacg	240
gtaaatggcc	cgcttggtg	acgcccac	gacccccgc	cattgacgtc	aataatgacg	300
tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttcattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	360
cggtaaactg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtcc	gccccctatt	420
gacgtcaatg	acggtaaatg	gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttacgggac	480
tttctactt	ggcagtacat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggg	gatgcggttt	540
tggcagtaca	ccaatgggcg	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	600
cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttgg	cacaaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	660
cgtaataacc	cgcgccgtt	gacgcaaatg	ggcggtaggc	gtgtacgggtg	ggaggctctat	720
ataagcagag	ctcgttttagt	gaaccgtcag	atcactagaa	gctttattgc	ggtagtttat	780
cacagttaaa	ttgctaacgc	agtcagtgtc	tctgacacaa	cagtctcgaa	cttaagctgc	840
agaagttggg	cgtgaggcac	tgggcaggta	agtatcaagg	ttacaagaca	ggtttaagga	900
gaccaataga	aactgggctt	gtcgagacag	agaagaactc	tgogtttctg	ataggcacct	960
attggtctta	ctgacatcca	ctttgccttt	ctctccacag	gtgtccactc	ccagttcaat	1020
tacagctctt	aaggctagag	tacttaatac	gactcactat	aggctagcgg	togatgttog	1080
caacgtcgat	cgtacgtgca	acgogttgca	cgtacgatcg	acgttgcgaa	catcgaccgc	1140
gatcgcgcca	ccatggaaga	tgccaaaaac	attaagaagg	gccagcgcc	attctaccca	1200
ctcgaagacg	ggaccgcgg	cgagcagctg	cacaaagcca	tgaagcgcta	cgccttggtg	1260
cccggcacca	tgcctttac	cgacgcacat	atcgaggtgg	acattaccta	cgcgagtac	1320
ttcgagatga	gcgttcggct	ggcagaagct	atgaagcgct	atgggctgaa	tacaaaccat	1380
oggatcgtgg	tgtgcagcga	gaatagcttg	cagttcttca	tgcccgtgtt	gggtgcctg	1440
ttcatcggtg	tggctgtggc	cccagctaac	gacatctaca	acgagcgoga	gctgctgaac	1500
agcatgggca	tcagccagcc	caccgtcgta	ttcgtgagca	agaaagggtc	gcasaagatc	1560
ctcaacgtgc	aaaagaagct	accgatcata	caaaagatca	tcatcatgga	tagcaagacc	1620
gactaccagg	gcttccaaag	catgtacacc	ttcgtgactt	cccatttgcc	acccggttc	1680
aacgagtacg	acttcgtgcc	cgagagcttc	gaccgggaca	aaaccatcgc	cctgatcatg	1740
aacagtagtg	gcagtaccgg	attgcccacg	ggcgtagccc	tacgcaccg	caccgcttgt	1800
gtccgattca	gtcatgcccg	cgaccccata	ttcggcaacc	agatcatccc	cgacaccgct	1860

```

atcctcagcg tgggtgccatt tcaccacggc ttccggcatgt tcaccacgct gggctacttg 1920
atctgcggct ttccgggtcgt gctcatgtac cgcttcgagg aggagctatt cttgcgcagc 1980
ttgcaagact ataagattca atctgccctg ctgggtgccca cactatttag cttcttcgct 2040
aagagcactc tcatcgacaa gtacgaccta agcaacttgc acgagatcgc cagcggcggg 2100
gcgcgcgtca gcaaggaggt aggtgaggcc gtggccaaac gcttccacct accaggcatc 2160
cgccagggct acggcctgac agaaacaacc agcgccattc tgatcacccc cgaaggggac 2220
gacaagcctg gcgcagtagg caaggtggtg cccttcttcg aggctaagggt ggtggacttg 2280
gacaccggta agacactggg tgtgaaccag cgcggcgagc tgtgcgtccg tggcccatg 2340
atcatgagcg gctacgttaa caaccccgag gctacaaacg ctctcatcga caaggacggc 2400
tggtgcaca gcggcgacat cgctactgg gacgaggacg agcacttctt catcgtggac 2460
cggctgaaga gcctgatcaa atacaagggc taccaggtag cccagccga actggagagc 2520
atcctgctgc aacaccccaa catcttcgac gccggggtcg ccggcctgcc cgacgacgat 2580
gccggcgagc tgcccgcgc agtcgtcgtg ctggaacacg gtaaaaccat gaccgagaag 2640
gagatcgtgg actatgtggc cagccagggtt acaaccgcca agaagctgcg cgggtggtgtt 2700
gtgttcgtgg acgaggtgcc taaaggactg accggcaagt tggacgcccg caagatccgc 2760
gagattctca ttaaggccaa gaagggcggc aagatcgccg tgtaataagc atgcggtcga 2820
tgttcgcaac gtcgatcgta cgtgcaacgc gttgcacgta cgatcgacgt tgogaacatc 2880
gaccaagctt gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa 2940
ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt 3000
tatttghtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta 3060
tgtttcaggt tcagggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat 3120
gtggtaaaat c 3131

```

<210> 813
 <211> 3029
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> expresión del gen indicador del plásmido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(832)
 <223> Potenciador y promotor I.E. de CMV

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (833)..(1029)
 <223> Intrón Promega

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1069)..(1100)

<223> secuencia de 32 pb en orientación directa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1115)..(1120)

<223> Secuencia Kozak

<220>

<221> misc_feature

<222> (1121)..(2770)

<223> Luciferasa

<220>

<221> misc_feature

<222> (2791)..(3029)

<223> Poli A de SV40

<400> 813

taggaagatc ttcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc	60
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata ataatatgta catttatatt	120
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttgg cattgattat tgactagtta ttaatagtaa	180
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg	240
gtaaatggcc cgcctggctg accgccaac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg	300
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta	360
cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gccccctatt	420
gacgtcaatg acggtaaatg gccgcctgg cattatgcc agtacatgac cttacgggac	480
tttccactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt	540
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac	600
cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaac aacgggactt tccaaaatgt	660
cgtataaacc cgcgccggt gacgcaaag ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat	720
ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcactagaa gctttattgc ggtagtttat	780
cacagttaaa ttgctaacgc agtcagtgt tctgacacaa cagtctcgaa cttaaagctgc	840
agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga	900
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct	960
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat	1020
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcgg togatgttcg	1080
caacgtcgat cgtacgtgca acgcgtgca tcgcgccacc atggaagatg ccaaaaacat	1140
taagaagggc ccagcgccat tctaccact cgaagacggg accgcggcg agcagctgca	1200
caaagccatg aagcgctacg ccctggtgcc cggcaccatc gcctttaccg acgcacatat	1260

cgaggtggac attacctacg ccgagtactt cgagatgagc gttcggctgg cagaagctat 1320
 gaagcgctat gggctgaata caaaccatcg gatcgtgggtg tgcagcgaga atagcttgca 1380
 gttcttcacg cccgtgttggt gtgccctgtt catcgggtgtg gctgtggccc cagctaacga 1440
 catctacaac gagcgcgagc tgctgaacag catgggcatc agccagccca ccgtcgtatt 1500
 cgtgagcaag aaagggctgc aaaagatcct caacgtgcaa aagaagctac cgatcataca 1560
 aaagatcatc atcatggata gcaagaccga ctaccagggc ttccaaagca tgtacacott 1620
 cgtgacttcc catttgccac ccggcttcaa cgagtacgac ttctgtgccc agagcttcga 1680
 ccgggacaaa accatcgccc tgatcatgaa cagtagtggc agtaccggat tgcccaaggg 1740
 cgtagcccta ccgcaccgca ccgcttgtgt ccgattcagt catgcccggc accccatctt 1800
 cggcaaccag atcatccccg acacogctat cctcagcgtg gtgccatttc accacggctt 1860
 cggcatgttc accacgctgg gctacttgat ctgcggcttt cgggtcgtgc tcatgtaccg 1920
 cttcgaggag gagctattct tgccgagctt gcaagactat aagattcaat ctgccctgct 1980
 ggtgccaca ctatttagct tcttcgctaa gagcactctc atcgacaagt acgacctaac 2040
 caacttgac gagatcgcca gcggcggggc gccgctcagc aaggaggtag gtgaggccgt 2100
 ggccaaacgc ttccacctac caggcatccg ccagggttac ggctgacag aaacaaccag 2160
 cgccattctg atcacccccg aaggggacga caagcctggc gcagtaggca aggtggtgcc 2220
 cttcttcgag gctaagggtg tggacttggc caccggtaag aactgggtg tgaaccagcg 2280
 cggcgagctg tgcgtccgtg gcccatgat catgagcggc tacgttaaca accccgaggc 2340
 tacaaacgct ctcatcgaca aggacggctg gctgcacagc ggcgacatcg cctactggga 2400
 cgaggacgag cacttcttca tcgtggaccg gctgaagagc ctgatcaaata acaagggtta 2460
 ccaggtagcc ccagccgaac tggagagcat cctgctgcaa caccccaaca tcttcgacgc 2520
 cggggtcgcc ggctgcccg acgacgatgc cggcgagctg cccgcgcag tcgtcgtgct 2580
 ggaacacggt aaaaccatga ccgagaagga gatcgtggac tatgtggcca gccaggttac 2640
 aacgcgaag aagctgcgcg gtggtgttgt gttcgtggac gaggtgccta aaggactgac 2700
 cggcaagttg gacgcccgca agatccgcga gattctcatt aaggccaaga agggcggcaa 2760
 gatcgccgtg taataagcat gcaagcttgc ggccgcttcg agcagacatg ataagataca 2820
 ttgatgagtt tggacaaaac acaactagaa tgcagtgaat aaaatgcttt atttgtgaaa 2880
 tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca gtttaacaaca 2940
 acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggagat gtgggaggtt ttttaagca 3000
 agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatc 3029

<210> 814

<211> 3067

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> expresión del gen indicador del plásmido		
5	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(832)		
	<223> Potenciador y promotor I.E. de CMV		
10	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (833)..(1029)		
	<223> Intrón Promega		
15	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1069)..(1100)		
	<223> secuencia de 32 pb en orientación directa		
20	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1115)..(1120)		
	<223> Secuencia Kozak		
25	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1121)..(2770)		
	<223> Luciferasa		
30	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (2783)..(2814)		
	<223> secuencia de 32 pb en orientación directa		
35	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (2829)..(3067)		
	<223> Poli A de SV40		
40	<400> 814		
	taggaagatc ttcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc	60	
	aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc ataatatgta ctttatatt	120	
	ggctcatgtc caatatgacc gccatgttgg cattgattat tgactagtta ttaatagtaa	180	
	tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg	240	
	gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg	300	
	tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta	360	
	cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gccccctatt	420	
	gacgtcaatg acggtaaatg gccgcctgg cattatgcc agtacatgac cttacgggac	480	
	tttcctactt ggcagtaacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggtt	540	
	tggcagtaca ccaatgggog tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac	600	

ccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt	660
cgtaataacc ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggg gtgtacgggtg ggaggtctat	720
ataagcagag ctctgttagt gaacogtcag atcactagaa gctttattgc ggtagtttat	780
cacagttaaa ttgctaacgc agtcagtgct tctgacacaa cagtctcgaa ctttaagctgc	840
agaagttggc cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga	900
gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggaacct	960
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat	1020
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcgg tcgatgttcg	1080
caacgtcgat cgtacgtgca acgcgtgca tgcgcgccacc atggaagatg ccaaaaacat	1140
taagaagggc ccagcgccat tctaccact cgaagacggg accgcccggc agcagctgca	1200
caaagccatg aagcgctacg cctgtgtgcc cggcaccatc gcctttaccg acgcacatat	1260
cgaggtggac attacctacg ccgagtactt cgagatgagc gtcggctgg cagaagctat	1320
gaagcgctat gggctgaata caaacatcg gatcggtgtg tgcagcgaga atagcttgca	1380
gttcttcctg cccgtgttg gtgccctgtt catcggtgtg gctgtggccc cagctaacga	1440
catctacaac gagcgcgagc tgctgaacag catgggcac agccagccca ccgtcgtatt	1500
cgtgagcaag aaagggctgc aaaagatcct caacgtgcaa aagaagctac cgatcataca	1560
aaagatcatc atcatggata gcaagaccga ctaccagggc ttccaaagca tgtacacctt	1620
cgtgacttcc catttgccac ccggcttcaa cgagtacgac ttcgtgcccg agagcttoga	1680
ccgggacaaa accatcgccc tgatcatgaa cagtagtggc agtaccggat tgcccaaggg	1740
cgtagcccta ccgcaccgca ccgcttgtgt ccgattcagt catgcccgcg accccatctt	1800
cggaaccag atcatccccg acacogctat cctcagcgtg gtgccatttc accacggctt	1860
cggcattgtc accacgctgg gctacttgat ctgcggcttt cgggtcgtgc tcatgtaccg	1920
cttcgaggag gagctattct tgcgcagctt gcaagactat aagattcaat ctgccctgct	1980
ggtgccaca ctatttagct tcttcgctaa gagcactctc atcgacaagt acgacctaa	2040
caacttgca gagatcgcca gggcggggc gccgctcagc aaggaggtag gtgaggcgt	2100
ggccaaacgc ttccacctac caggcatccg ccagggtac ggcctgacag aaacaaccag	2160
cgccattctg atcacccccg aaggggacga caagcctggc gcagtaggca aggtggtgcc	2220
cttcttcgag gctaaggtgg tggacttggc caccggtaag aactgggtg tgaaccagcg	2280
cggcgagctg tgcgtcgtg gcccatgat catgagcggc tacgttaaca acccogaggg	2340
tacaaacgct ctcatcgaca aggacggctg gctgcacagc ggcgacatcg cctactggga	2400
cgaggacgag cacttcttca tcgtggaccg gctgaagagc ctgatcaaat acaagggcta	2460

```

ccaggtagcc ccagccgaac tggagagcat cctgctgcaa caccccaaca tcttcgacgc 2520
cggggtcgcc ggccctgccg acgacgatgc cggcgagctg cccgccgcag tcgtcgctgct 2580
ggaacacgggt aaaaccatga ccgagaagga gatcgtggac tatgtggcca gccaggttac 2640
aaccgccaaag aagctgcgcg gtggtgttgt gttcgtggac gaggtgccta aaggactgac 2700
cggcaagttg gacgcccgca agatccgcga gattctcatt aaggccaaga agggcggcaa 2760
gatcgccgtg taataagcat gcggtcgatg ttcgcaacgt cgatcgtaac tgcaacgcgt 2820
aagcttgccg ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac 2880
aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 2940
tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt 3000
tcagggttcag ggggagatgt gggagggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaattgtg 3060
taaaatc 3067

```

5 <210> 815
 <211> 3067
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> expresión del gen indicador del plásmido

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(832)
 <223> Potenciador y promotor I.E. de CMV

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (833)..(1029)
 <223> Intrón Promega

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1069)..(1100)
 <223> secuencia de 32 pb en orientación directa

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1115)..(1120)
 <223> Secuencia Kozak

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1121)..(2770)
 <223> Luciferasa

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2789)..(2820)
 <223> secuencia de 32 pb en orientación directa

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2829)..(3067)
 <223> Poli A de SV40

<400> 815

taggaagatc ttcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc	60
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc ataatatgta catttatatt	120
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttgg cattgattat tgactagtta ttaatagtaa	180
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg	240
gtaaatggcc cgcctggctg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg	300
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta	360
cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gccccctatt	420
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac	480
tttctacttt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggg gatgcggttt	540
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac	600
cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt	660
cgtaataacc ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggtg ggaggtctat	720
ataagcagag ctcgtttagt gaacggtcag atcactagaa gctttattgc ggtagtttat	780
cacagttaaa ttgctaacgc agtcagtgtc tctgacacaa cagtctcgaa cttagctgc	840
agaagttggg cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga	900
gaccaataga aactgggctt gtogagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct	960
attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat	1020
tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcgg tcgatgttcg	1080
caacgtcgat cgtacgtgca acgctgcca tcgcgccacc atggaagatg ccaaaaacat	1140
taagaagggc ccagcgccat tctaccact cgaagacggg accgcggcg agcagctgca	1200
caaagccatg aagcgctacg ccctggtgcc cggcaccatc gcctttaccg acgcacatat	1260
cgaggtggac attacctacg ccgagtactt cgagatgagc gttcggtgg cagaagctat	1320
gaagcgctat gggctgaata caaaccatcg gatcggtgtg tgcagcgaga atagcttgca	1380
gttcttcatg cccgtgttgg gtgccctgtt catcggtgtg gctgtggccc cagctaacga	1440
catctacaac gagcgcgagc tgctgaacag catgggcata agccagccca ccgtcgtatt	1500
cgtgagcaag aaagggctgc aaaagatcct caacgtgcaa aagaagctac cgatcataca	1560
aaagatcatc atcatggata gcaagaccga ctaccagggc ttocaaagca tgtacacctt	1620
cgtgacttcc catttgccac ccggcttcaa cgagtacgac ttcgtgcccg agagcttcga	1680
ccgggacaaa accatcgccc tgatcatgaa cagtagtggc agtaccggat tgcccaaggg	1740

```

cgtagcccta ccgcaccgca ccgcttgtgt ccgattcagt catgcccgcg accccatctt 1800
cggcaaccag atcatccccg acaccgctat cctcagcgtg gtgccatttc accacggctt 1860
cggcatgttc accacgctgg gctacttgat ctgcggcttt cgggtcgtgc tcatgtaccg 1920
cttcgaggag gagctattct tgcgcagctt gcaagactat aagattcaat ctgccctgct 1980
ggtgccaca ctatttagct tcttcgctaa gagcactctc atcgacaagt acgacctaa 2040
caacttgcac gagatcgcca gcggcggggc gccgctcagc aaggaggtag gtgaggccgt 2100
ggccaaacgc ttccacctac caggcatcog ccagggctac ggcctgacag aaacaaccag 2160
cgccattctg atcacccccg aaggggacga caagcctggc gcagtaggca aggtggtgcc 2220
cttcttcgag gctaagggtg tggacttggc caccggtaag aactgggtg tgaaccagcg 2280
cggcgagctg tgcgtccgtg gcccctgat catgagcggc tacgttaaca accccgaggc 2340
tacaaacgct ctcatcgaca aggacggctg gctgcacagc ggcgacatcg cctactggga 2400
cgaggacgag cacttcttca tcgtggaccg gctgaagagc ctgatcaaata acaagggcta 2460
ccaggtagcc ccagccgaac tggagagcat cctgctgcaa caccccaaca tcttcgaogc 2520
cggggtcgcc ggcttgcggc acgacgatgc cggcgagctg cccgccgcag tcgtcgtgct 2580
ggaacacggt aaaaccatga ccgagaagga gatcgtggac tatgtggcca gccaggttac 2640
aaccgccaag aagctgcgcg gtggtgttgt gttcgtggac gaggtgccta aaggactgac 2700
cggcaagttg gacgcccgcg agatccgcga gattctcatt aaggccaaga agggcgga 2760
gatcgccgtg taataagcat gcacgcgttg cacgtacgat cgacgttgcg aacatcgacc 2820
aagcttgccg ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac 2880
aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 2940
tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt 3000
tcaggttcag ggggagatgt gggagggttt ttaaagcaag taaaacctct acaaagtgtg 3060
taaaatc 3067

```

<210> 816
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> *Renilla reniformis*
 <400> 816

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
 20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu

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

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

5 <210> 817
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de ablación

 10 <400> 817
 ggtcggcgac gcgtaatcgt cgattggcgt ac 32

 15 <210> 818
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enzima FokI modificada

 20 <400> 818

 Met Pro Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe
 1 5 10 15

 Ser Gln Arg Arg Ser Leu Gly His His Gln Arg Thr His
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la administración mediada por VAA de un producto terapéutico que tiene un sistema de ablación de expresión transgénica controlada, comprendiendo dicha composición
 - (a) un vector VAA que contiene una molécula de ácido nucleico que comprende:
 - (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto terapéutico unido operativamente a un promotor que controla la transcripción; y
 - (ii) al menos un sitio de ablación de endonucleasa que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos de 30 pares de bases reconocida específicamente por al menos diez (10X) dedos de cinc, localizándose dicho al menos un sitio de ablación de endonucleasa al menos en posición 5' con respecto a la secuencia que codifica el producto terapéutico;
 - (b) al menos un ablacionador que comprende una endonucleasa química que comprende al menos diez copias de un dominio de dedo de cinc, unida a un dominio catalítico de endonucleasa funcional en asociación operativa con un promotor, en el que la actividad de transcripción y/o ablación está inducida en respuesta a un agente farmacológico, reconociendo dicho dominio de al menos diez (10X) dedos de cinc específicamente dicha secuencia de al menos 30 pares de bases de (a) (ii) en dicho al menos un sitio de ablación de endonucleasa y que comprende al menos 10 hélices de reconocimiento.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el dominio catalítico de endonucleasa es un dominio catalítico de FokI.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que las al menos 10 hélices de reconocimiento son todas diferentes.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que las al menos 10 hélices de reconocimiento incluyen hélices de reconocimiento diferentes para el mismo triplete de pares de bases en el sitio de ablación.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las al menos 10 hélices de reconocimiento contienen de 1 a 3 hélices que son iguales.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la secuencia de al menos 30 pares de bases en el sitio de ablación de endonucleasa comprende al menos 32 pares de bases.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la molécula comprende un primer sitio de ablación de endonucleasa y un segundo sitio de ablación de endonucleasa, en la que dicho primer sitio y dicho segundo sitio de ablación de endonucleasa pueden ser la misma o diferente secuencia exclusiva.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que tanto el primer sitio de ablación de endonucleasa como el segundo sitio de ablación de endonucleasa se localizan en posición 5' con respecto a la secuencia codificante y están separados por una secuencia espaciadora.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el segundo sitio de ablación de endonucleasa está invertido.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la secuencia espaciadora es una secuencia no codificante.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho segundo sitio de ablación de endonucleasa está localizado en posición 3' con respecto a la secuencia codificante.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el dominio catalítico de la endonucleasa está unido a la secuencia del dominio catalítico de dedo de cinc en el extremo N o C de la secuencia del dominio catalítico del dedo de cinc.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el dominio catalítico está unido a la secuencia del dominio catalítico de dedo de cinc por medio de una secuencia enlazadora.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el dominio catalítico de la endonucleasa se localiza dentro de la secuencia del dominio de dedo de cinc.
15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la molécula de ácido nucleico está constituida por una molécula de ADN bicatenario, en la que el al menos un sitio de ablación de

endonucleasa está sobre una primera cadena de la molécula de ADN y al menos un segundo sitio de ablación de endonucleasa está localizado sobre la segunda cadena de la molécula de ADN, en la que dicho segundo sitio de ablación de endonucleasa es diferente a dicho sitio de ablación de endonucleasa sobre la primera cadena y está reconocido de manera específica y selectiva por un dedo de cinc diferente.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia de al menos 30 pares de bases se selecciona del grupo constituido por:

(i) SEC ID N°: 806: 5' - GGTTCGATGTTTCGCAACGTCGATCGTACGTGCA - 3';

(ii) SEC ID N°: 801: 5' - GGTGCGCGACGCGAATCGTCGATTGGCGTAC - 3'

y

(iii) SEC ID N°: 803: 5' - ACTATTCGCACGCCGTACGATAGTCGGCGCGA - 3'.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho dominio de dedo de cinc comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos diez dedos de cinc constituidos por: (a) un primer dedo de cinc N- terminal que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a TGC; (b) un segundo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a ACG; (c) un tercer dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a CGT; (d) un cuarto dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GAT; (e) un quinto dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GTC; (f) un sexto dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a AAC; (g) un séptimo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une a CGC; (h) un octavo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GTT; (i) un noveno dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GAT; y (j) décimo dedo de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que se une específicamente a GTC.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la que:

la hélice de reconocimiento de (a) que se une específicamente a TGC, se selecciona del grupo constituido por: ARNTLVH, QRRSLGH, QARSLRA, QQRSLKN, y QNRSLAH, QGRSLRA, RARNLTL, RGRNLEM, RKRNLIM, RMRNLII, RNRNLVL, RRRNLHL, RRRNLTL, RSRNLDI, RSRNLLL y RSRNLTL (SEC ID N°: 658 a 673);

la hélice de reconocimiento de (b) que se une específicamente a ACG se selecciona del grupo constituido por: KNNDLTR; KRIDLQR; RKHDLNM; RRQTLRQ; KGNDLTR; PSQTLAWQ; RNITLVR, RSHDLTV, ASADLTR, QNATRKR, QSGDLTR, RSQTLAQ; y RTDTLRD (SEC ID N°: 104 a 119);

la hélice de reconocimiento de (c) que se une específicamente a CGT se selecciona del grupo constituido por RSQTRKT (SEC ID N°: 154) y SRRTCRA (SEC ID N°: 155);

la hélice de reconocimiento de (d) que se une específicamente a GAT se selecciona del grupo constituido por VRHNLTR, ISHNLAR, ISSNLQR, LGNNLKR, LNSNLAR, LSTNLTR, LTHNLRR, QSSNLAR, RSDALIQ, SKQALAV, TGQQLRV, TKQRLW, TRQRLRI, TSANLSR, TSGNLVR, TSQMLVV, TSSNLSR, TTSNLRR, VGHNLSR, VGSNLTR (SEC ID N°: 251 a 270);

la hélice de reconocimiento de (e) que se une específicamente a GTC se selecciona del grupo constituido por DRTSLAR, DHSSLKR, APSSLRR, DATQLVR, DPGALVR, DPTSLNR, DRSALAR, DRSALSR, DRSSLRR, DRTPLNR, DRTPLQN, EGGALRR, ESGALRR, NTSLRR, RSDVLSE, TGAVLRR, TGAVLTR, TKKILTV, TKSLLAR, TMAVLRR, TRAVLRR, TSTILAR, TSTLLKR y TSTLLNR (SEC ID N°: 530 a 553);

la hélice de reconocimiento de (f) que se une específicamente a AAC se selecciona del grupo constituido por DRSNRKT, DSGNLRV, GASALRQ, GASALRS, GGTALRM, GGTALVM, GHTALAL, GHTALRH, GHTALRN, GP-TALVN y HRTNLIA (SEC ID N°: 63 a 73);

la hélice de reconocimiento de (g) que se une específicamente a CGC es HTGHILLE (SEC ID N°: 151);

la hélice de reconocimiento de (h) que se une específicamente a GTT se selecciona del grupo constituido por HKSSLTR, TNQALGV, AATALRR, HHNSLTR, HSSSLVR, IKAILTR, INHSLRR, IRTSLKR, MNSVLKR, MTSSLRR, QATLLRR, QSSALTR, THTVLAR, TKPVLKI, TNSVLGR, TRHSLGR, TSGALTR, TSGSLTR, TSGSLVR, TSTLLKR, TSTRLDI, TTALLKR, TTSALTR, TTTVLAR y VGGSLNR (SEC ID N°: 583 a 607);

la hélice de reconocimiento de (i) que se une específicamente a GAT se selecciona del grupo constituido por ISHNLAR, VRHNLTR, ISSNLQR, LGNNLKR, LNSNLAR, LSTNLTR, LTHNLRR, QSSNLAR, RSDALIQ, S KQALAV, TGQQLRV, TKQRLVV, TRQRLRI, TSANLSR, TSGNLVR, TSQMLVV, TSSNLSR, TTSNLRR, VGHNLSR y VGSNLTR (SEC ID N°: 251 a 270);

y

la hélice de reconocimiento de (j) que se une específicamente a GTC se selecciona del grupo constituido por DRTSLAR, DHSSLRKR, APSSLRR, DATQLVR, DPGALVR, DPTSLNR, DRSALAR, DRSALSR, DRSSLRR, DRTPLNR, DRTPLQN, EGGALRR, ESGALRR, NTSLRR, RSDVLSE, TGAVLRR, TGAVLTR, TKKILTV, TKSLLAR, TMAVLRR, TRAVLRR, TSTILAR, TSTLLKR y TSTLLNR (SEC ID N°: 530 a 553).

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que cada uno de los dedos de cinc de (a) a (j) tiene el dominio de reconocimiento seleccionado insertado en una construcción de dedo de cinc seleccionada entre:

SEC ID N°: 745: (extremo N) - PGEKPYKCECGKSFS - XXXXXXX - HQRTH (extremo carboxilo), COOH y

SEC ID N°: 807: (extremo N) - TGEKPFQCRICMRNFS - XXXXXXX- HLRTH (extremo carboxilo), COOH, en la que XXXXXXX es el dominio de reconocimiento de dedo de cinc.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que:

la hélice de reconocimiento de (a) que se une específicamente a TGC es QRRSLGH (SEC ID N°: 663);
la hélice de reconocimiento de (b) que se une específicamente a ACG es KKNDLTR (aa 29-56 de SEC ID N°: 60);
la hélice de reconocimiento de (c) que se une específicamente a CGT es SRRTCRA (SEC ID N°: 155);
la hélice de reconocimiento de (d) que se une específicamente a GAT es VRHNLTR (SEC ID N°: 270);
la hélice de reconocimiento de (e) que se une específicamente a GTC es DRTSLAR (SEC ID N°: 64);
la hélice de reconocimiento de (f) que se une específicamente a AAC es DSGNLRV (SEC ID N°: 540);
la hélice de reconocimiento de (g) que se une específicamente a CGC es HTGHLLE (SEC ID N°: 151);
la hélice de reconocimiento de (h) que se une específicamente a GTT es TNQALGV (aa 197-224 de SEC ID N°: 60);
la hélice de reconocimiento de (j) que se une específicamente a GAT es VRHNLTR (SEC ID N°: 270);
y
la hélice de reconocimiento de (k) que se une específicamente a GTC es DRTSLAR (SEC ID N°: 540).

21. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia de dedo de cinc está unida a la secuencia que codifica un dominio catalítico de FokI por medio de una secuencia que codifica cinco aminoácidos GTSGK (SEC ID N°: 805), por lo que el ablacionador químico resultante corta 6pb directamente después del sitio de unión de dedo de cinc.

22. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que la transcripción del promotor está controlada por un sistema regulable por rapamicina.

23. La composición de acuerdo con la reivindicación 19, en la que el agente farmacológico es rapamicina o un rapálogo.

24. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que el ablacionador (b) está controlado por un casete que está activado por un factor de transcripción después de la dimerización por un agente farmacológico, comprendiendo dicho casete dos unidades de transcripción, en el que:

(c) una de dichas dos unidades de transcripción codifica el dominio de unión a ADN del factor de transcripción fusionado con un dominio de unión para el agente farmacológico en asociación operativa con un primer promotor y
(d) una segunda de dichas dos unidades de transcripción codifican el dominio de activación del factor de transcripción fusionado con un dominio de unión para el agente farmacológico en una asociación operativa con un segundo promotor.

25. La composición de la reivindicación 24, en la que el primer promotor de (c) y el segundo promotor de (d) se seleccionan independientemente entre un promotor constitutivo y un promotor inducible.

26. La composición de la reivindicación 25, en la que tanto el primer promotor, como el segundo promotor, son promotores constitutivos y el agente farmacológico es un dimerizador que dimeriza los dominios del factor de transcripción.

27. La composición de la reivindicación 24, en la que uno del primer promotor y del segundo promotor es un promotor inducible.

28. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que es adecuada para controlar la administración de un producto transgénico.

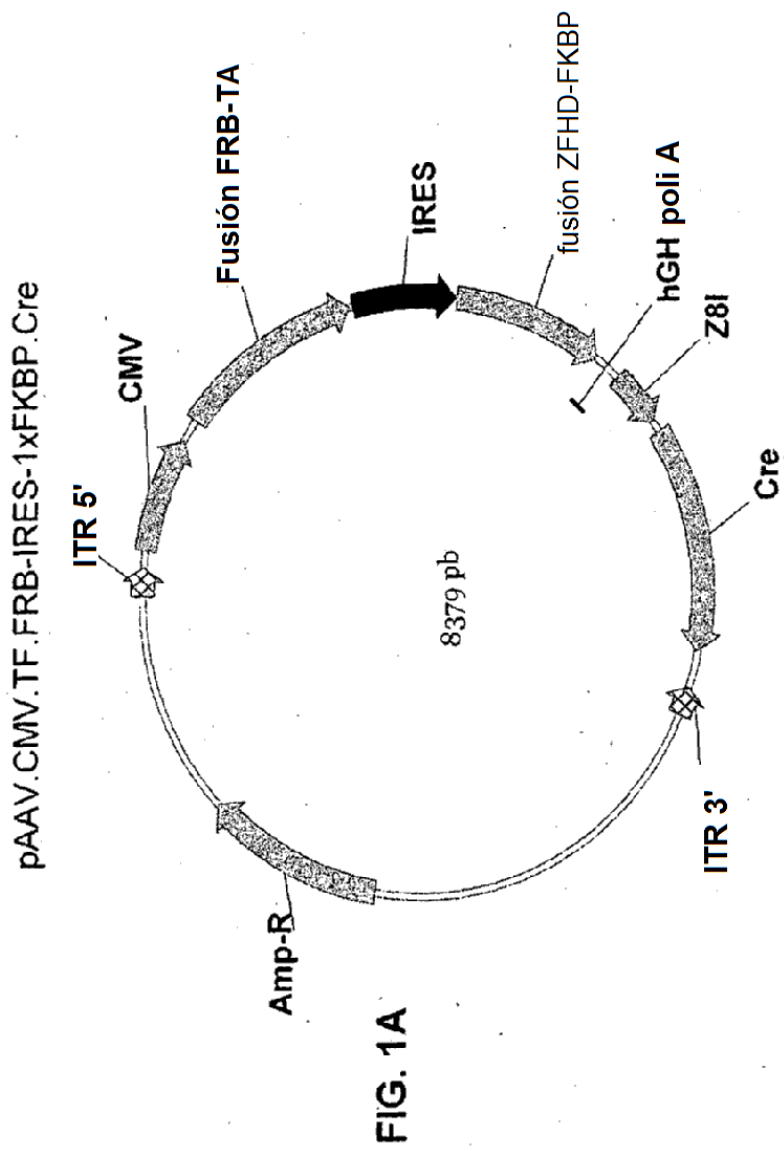


FIG. 1B



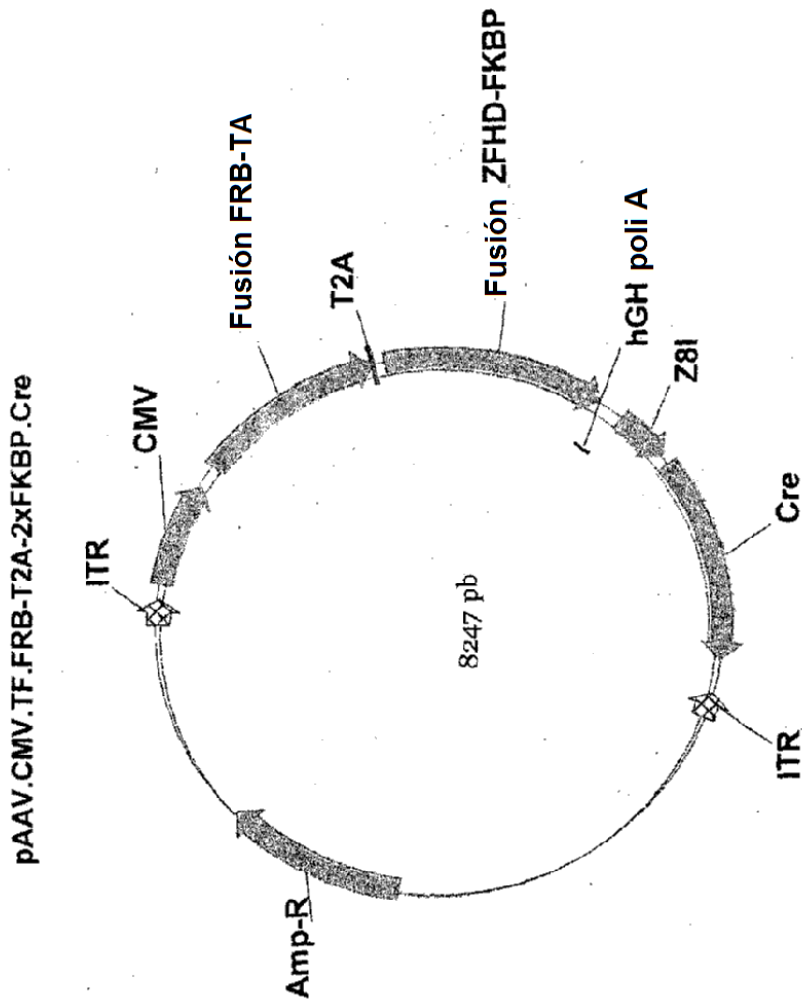


FIG. 2A

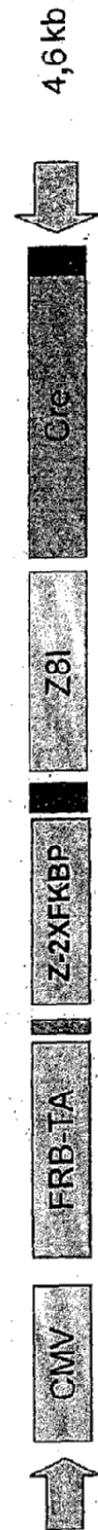


FIG. 2B

pAAV.CMV173.TF.FRB-T2A-3xFKBP.Cre

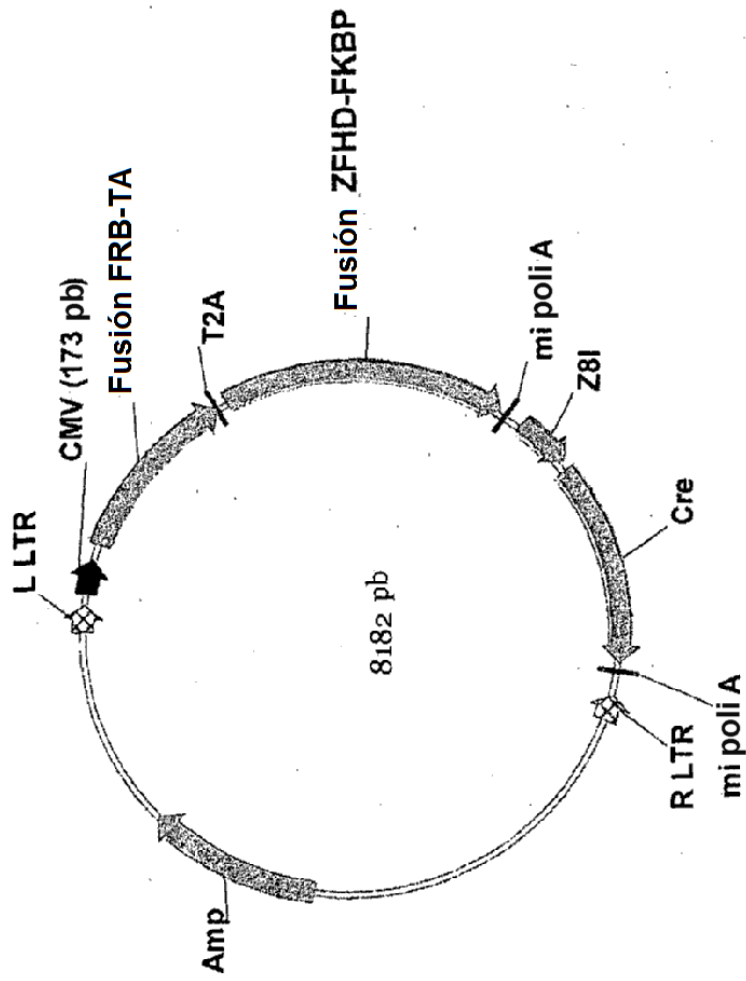


FIG. 3A

FIG. 3B



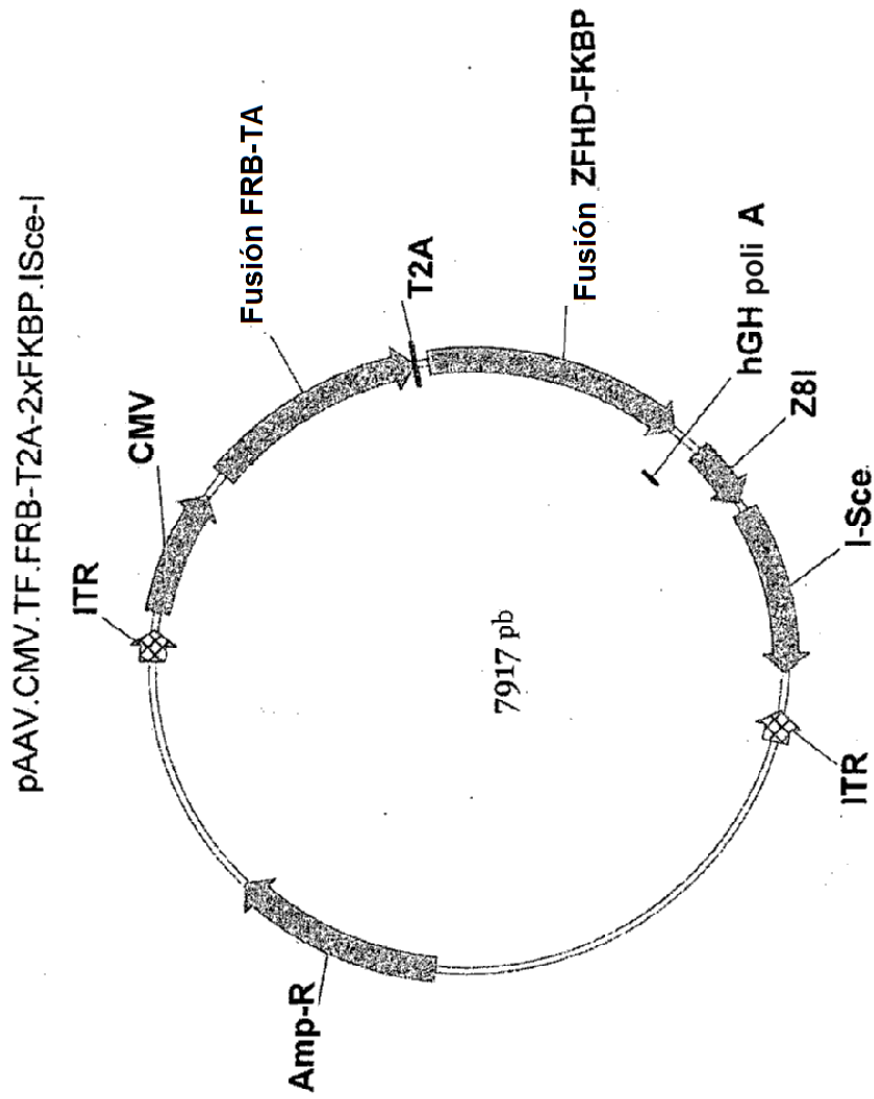


FIG. 4A



FIG. 4B

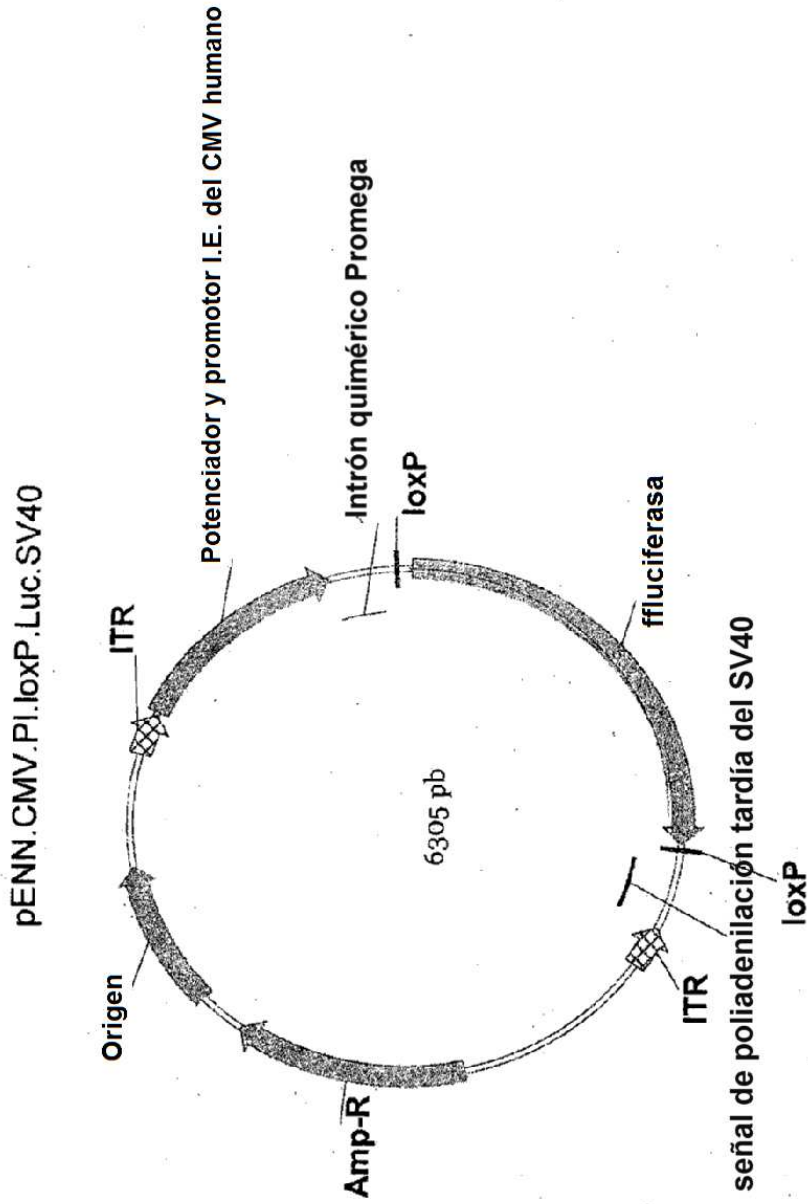


FIG. 5A



FIG. 5B

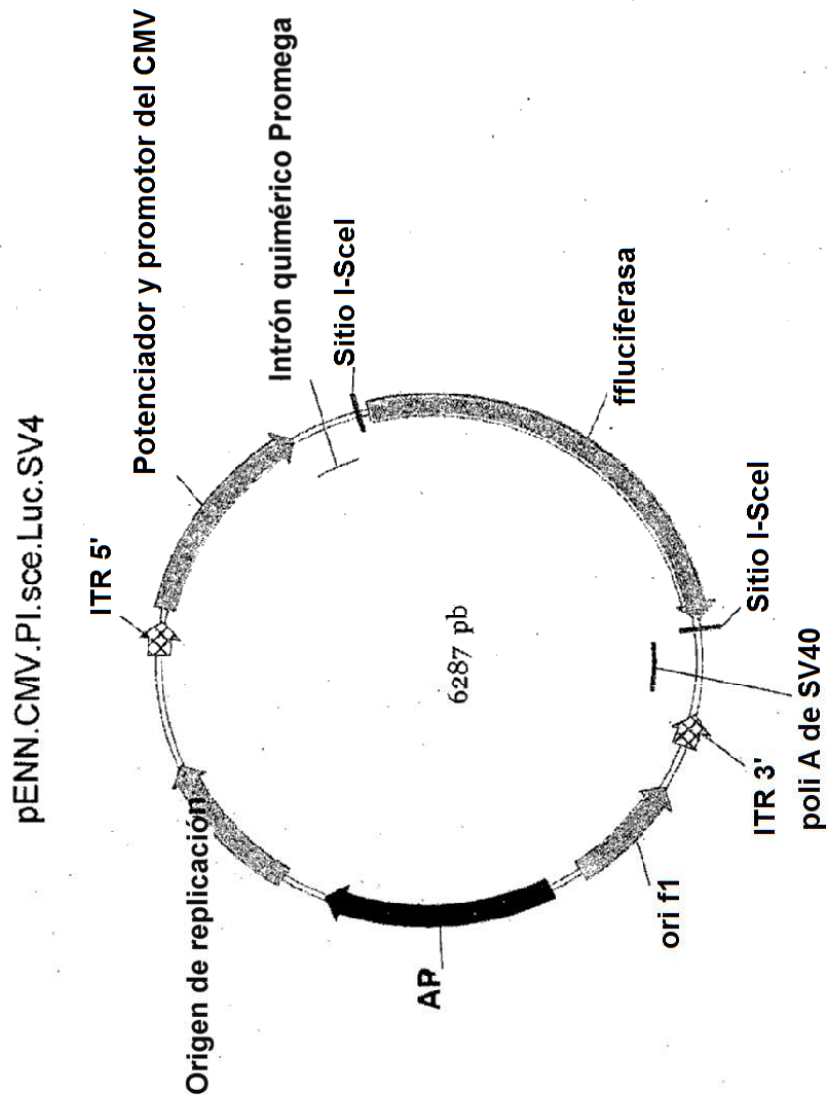


FIG. 6A



FIG. 6B

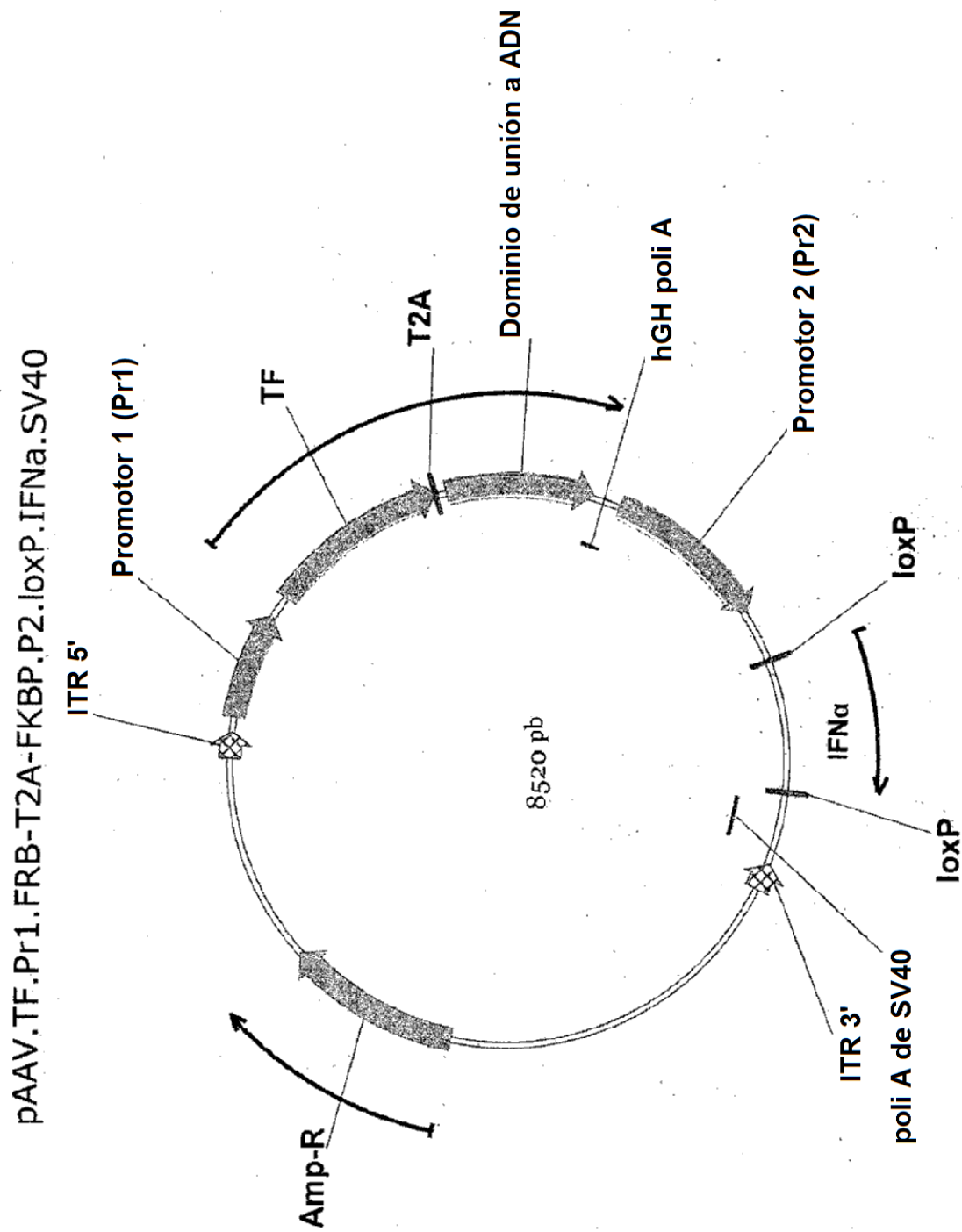


FIG. 7

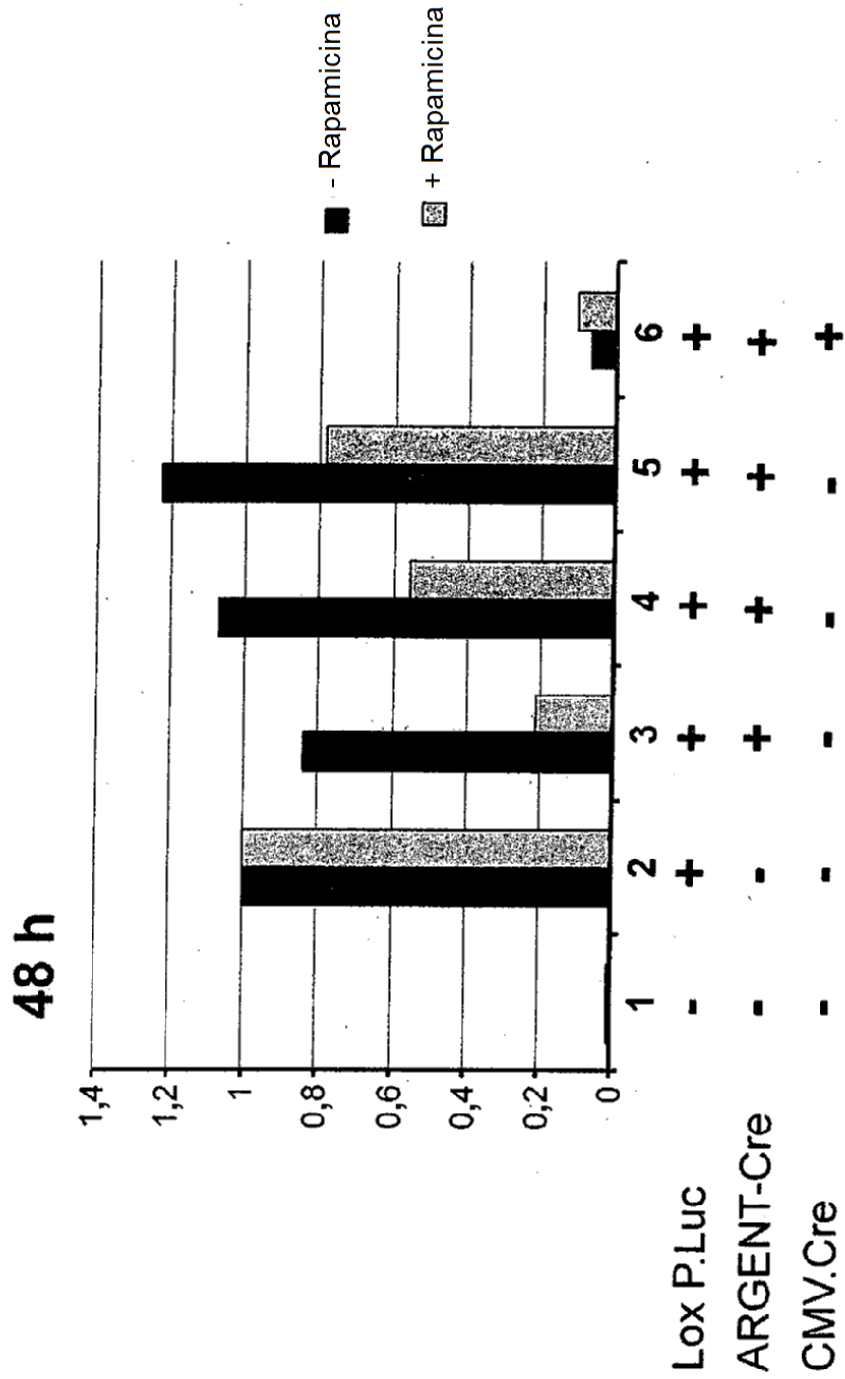


FIG. 8A

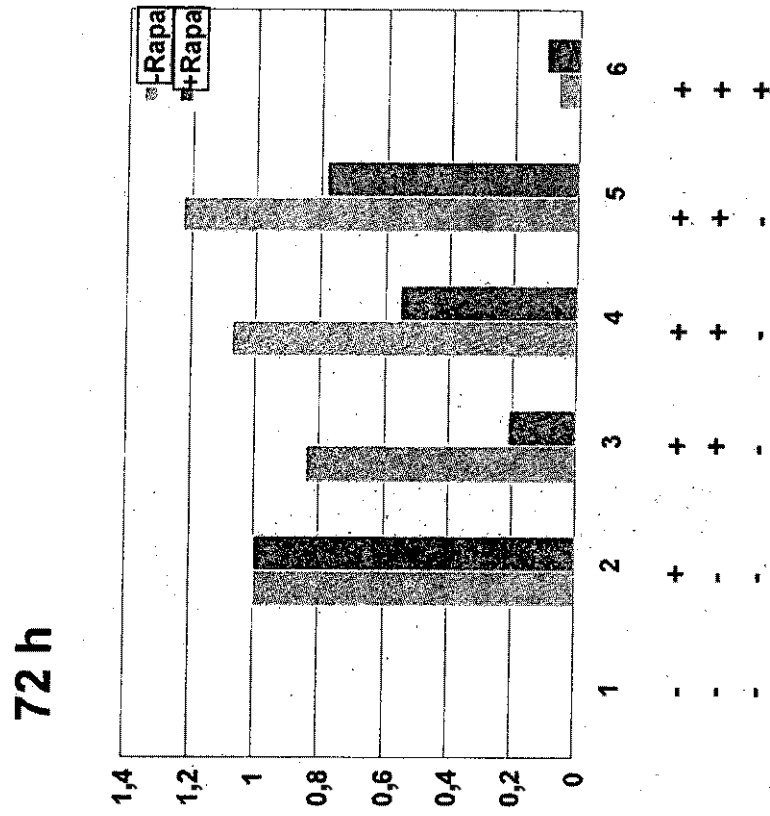


FIG. 8B

FIG. 9A

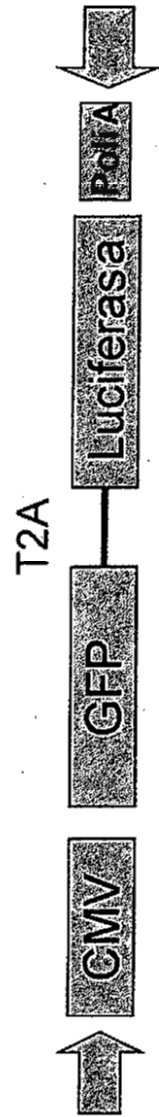


FIG 9B

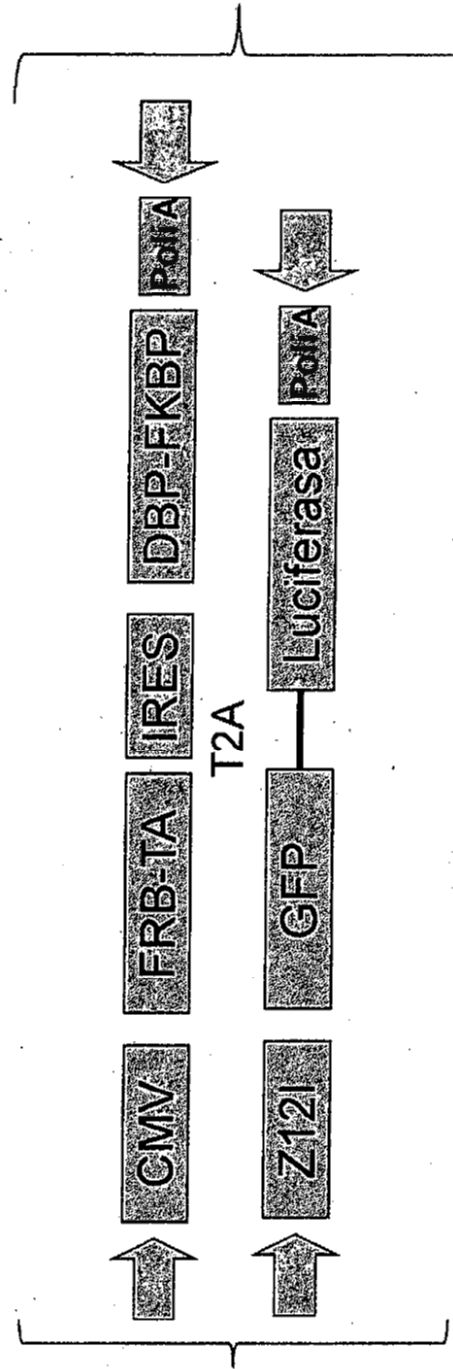


FIG. 9C

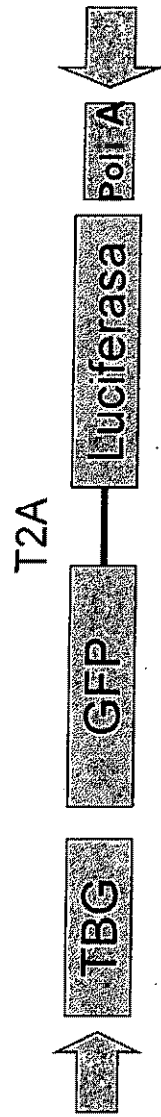
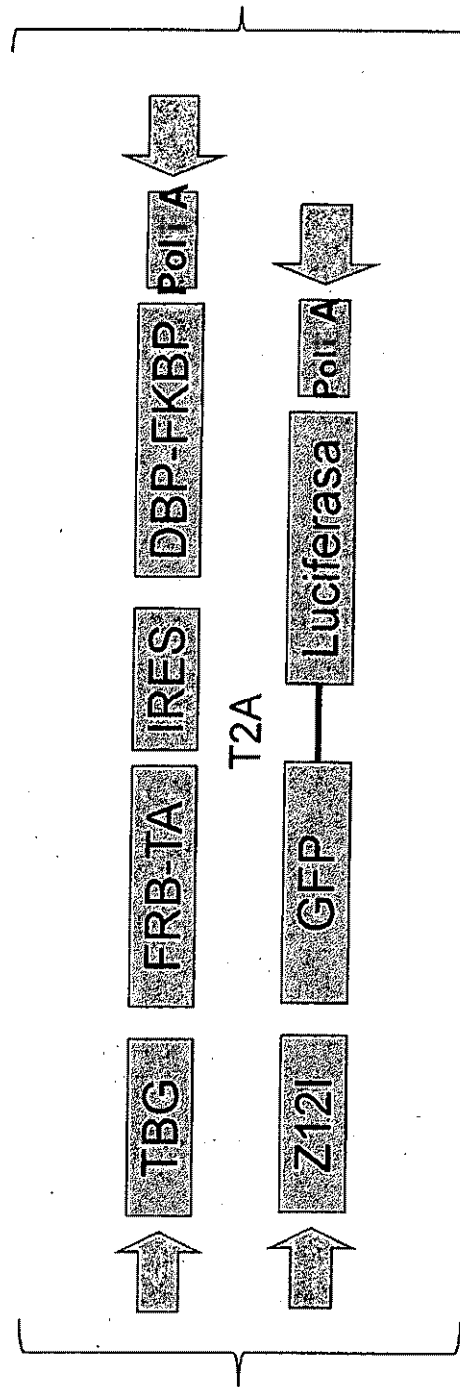
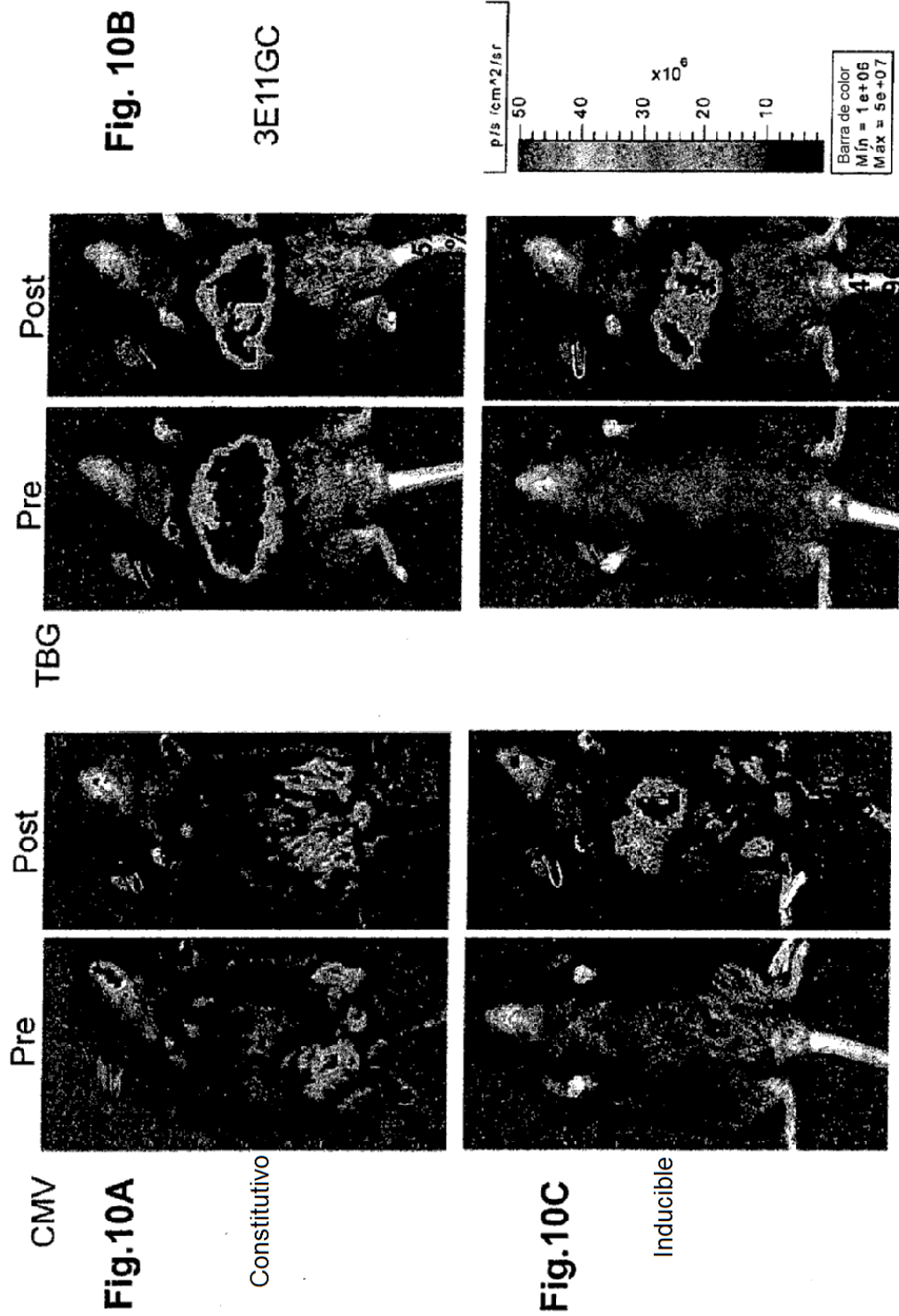
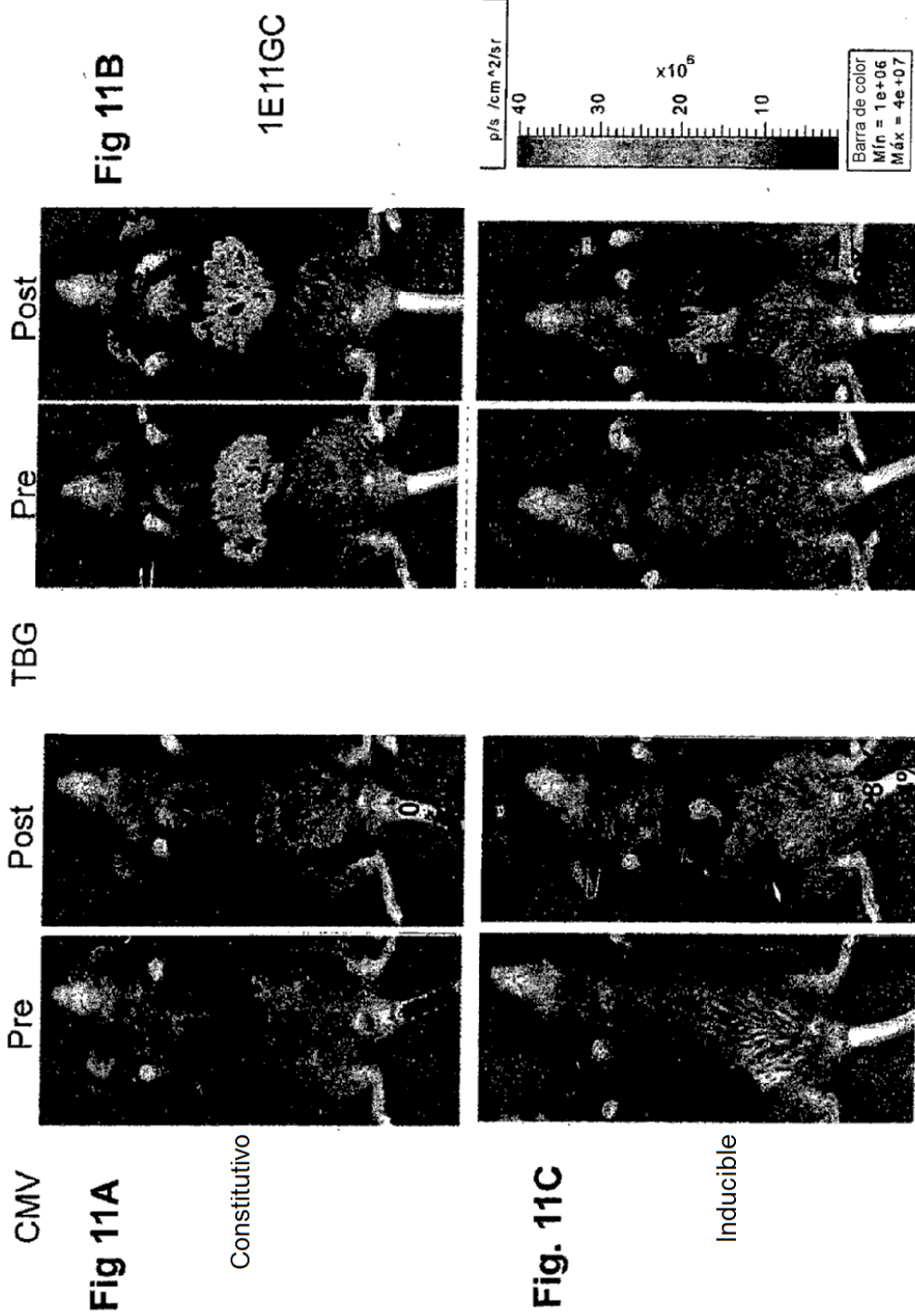


FIG 9D







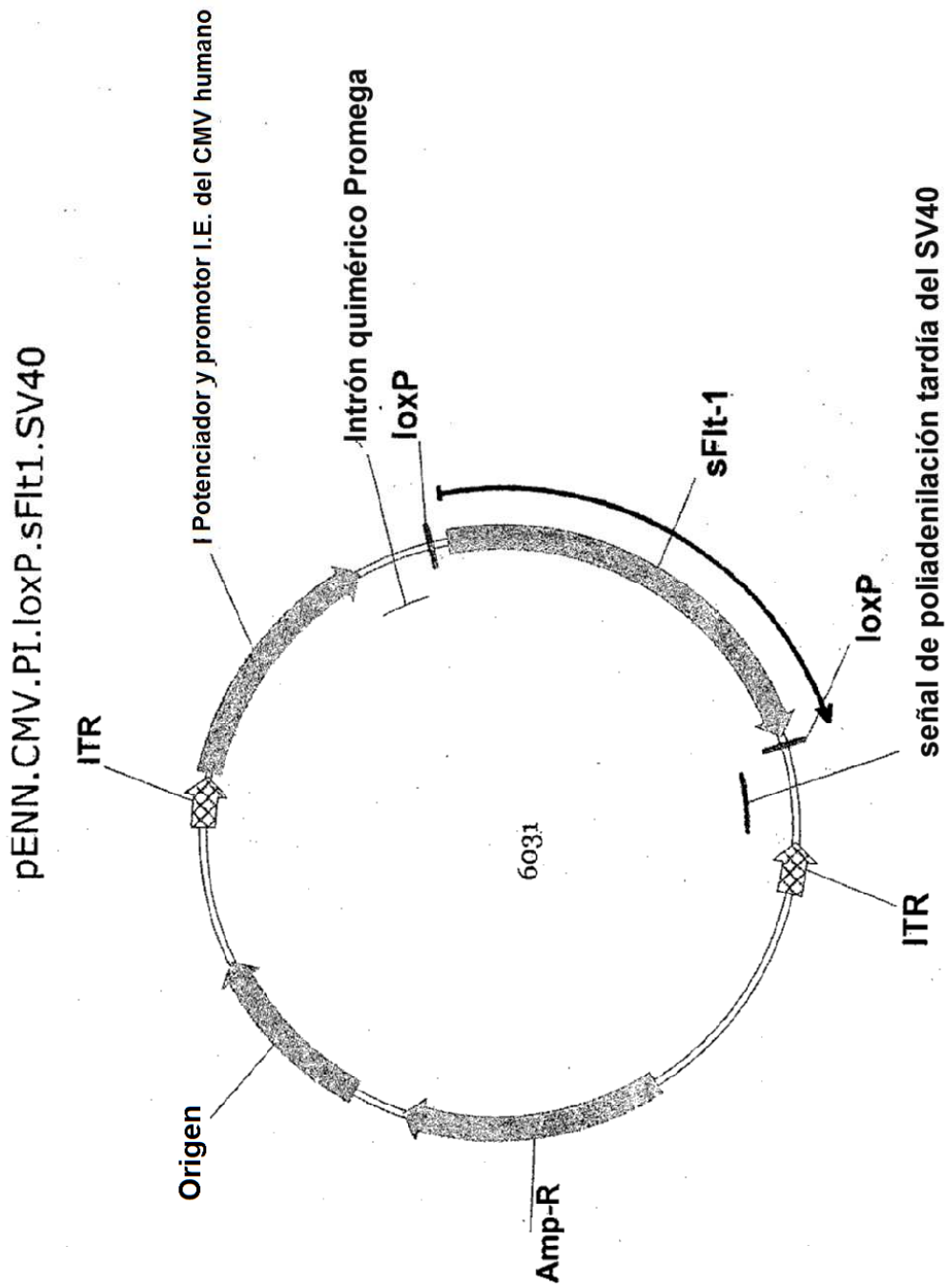


FIG. 12A

pENN.AAV.CMV.PI.loxP.AvastínH-IRES-AvastínL.SV40

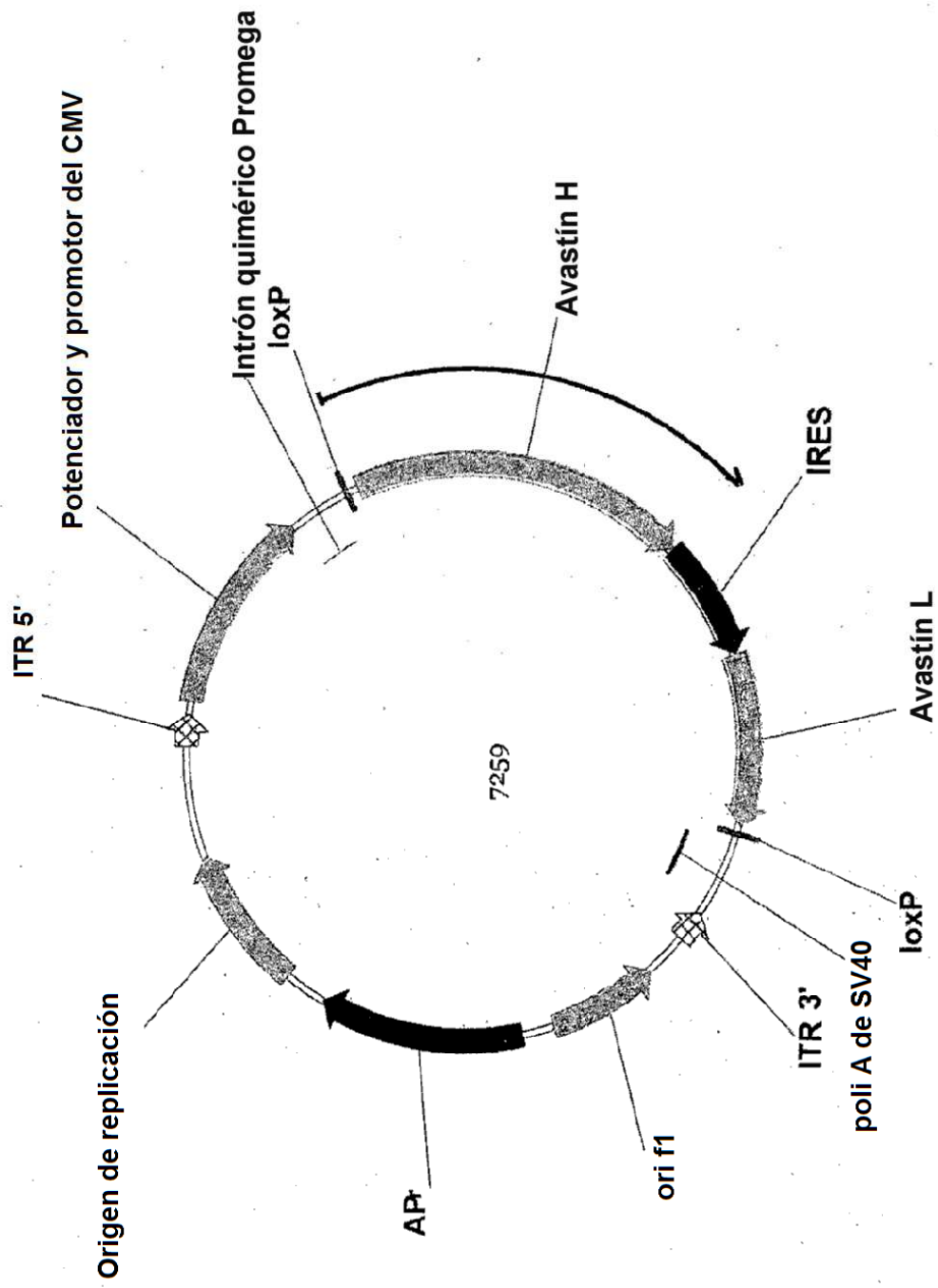


FIG. 12B

pENN.AAV.CMV.PI.loxP.AvastínH-T2A-AvastínL.SV40

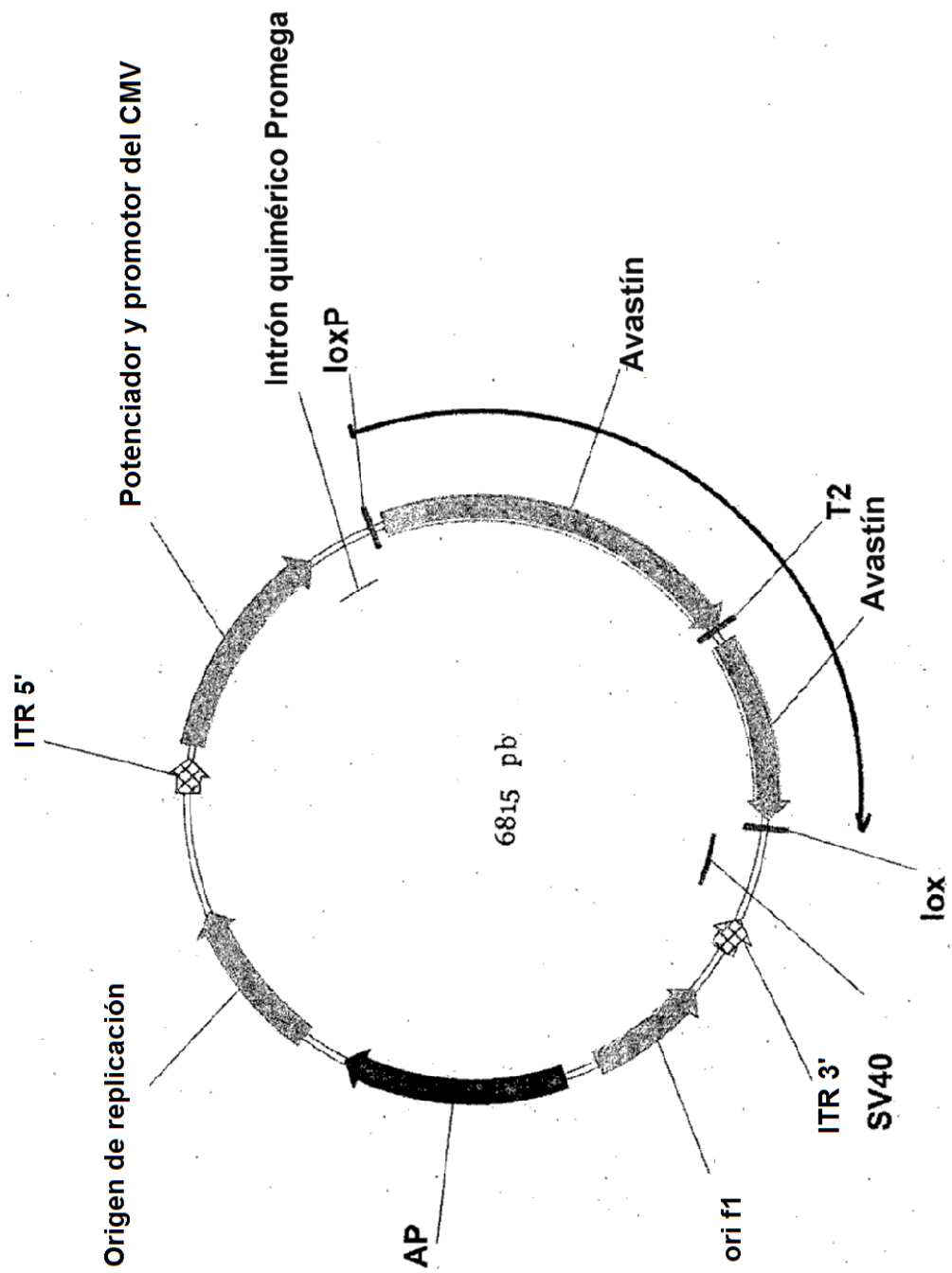


FIG. 12C

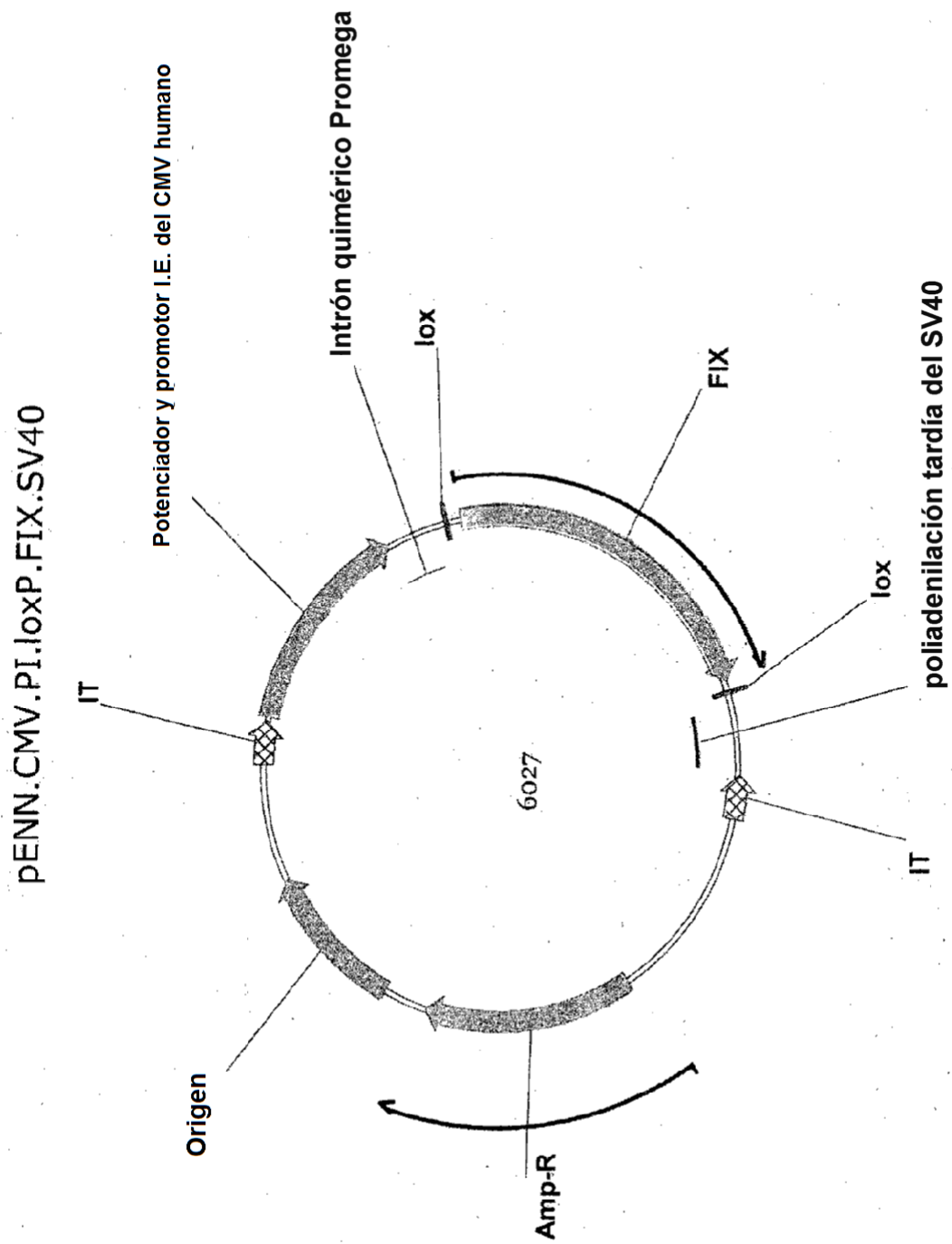


FIG. 13A

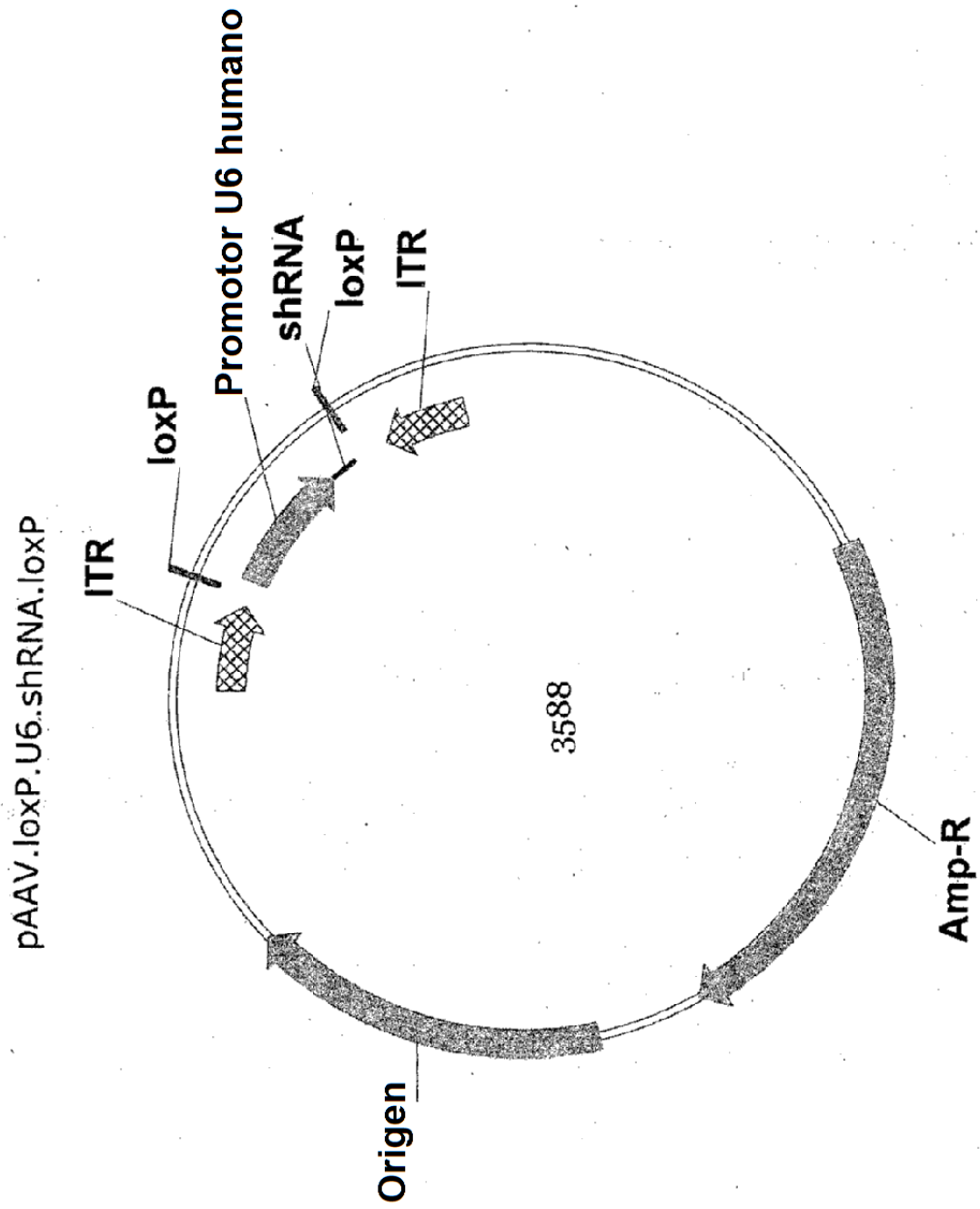


FIG. 13B

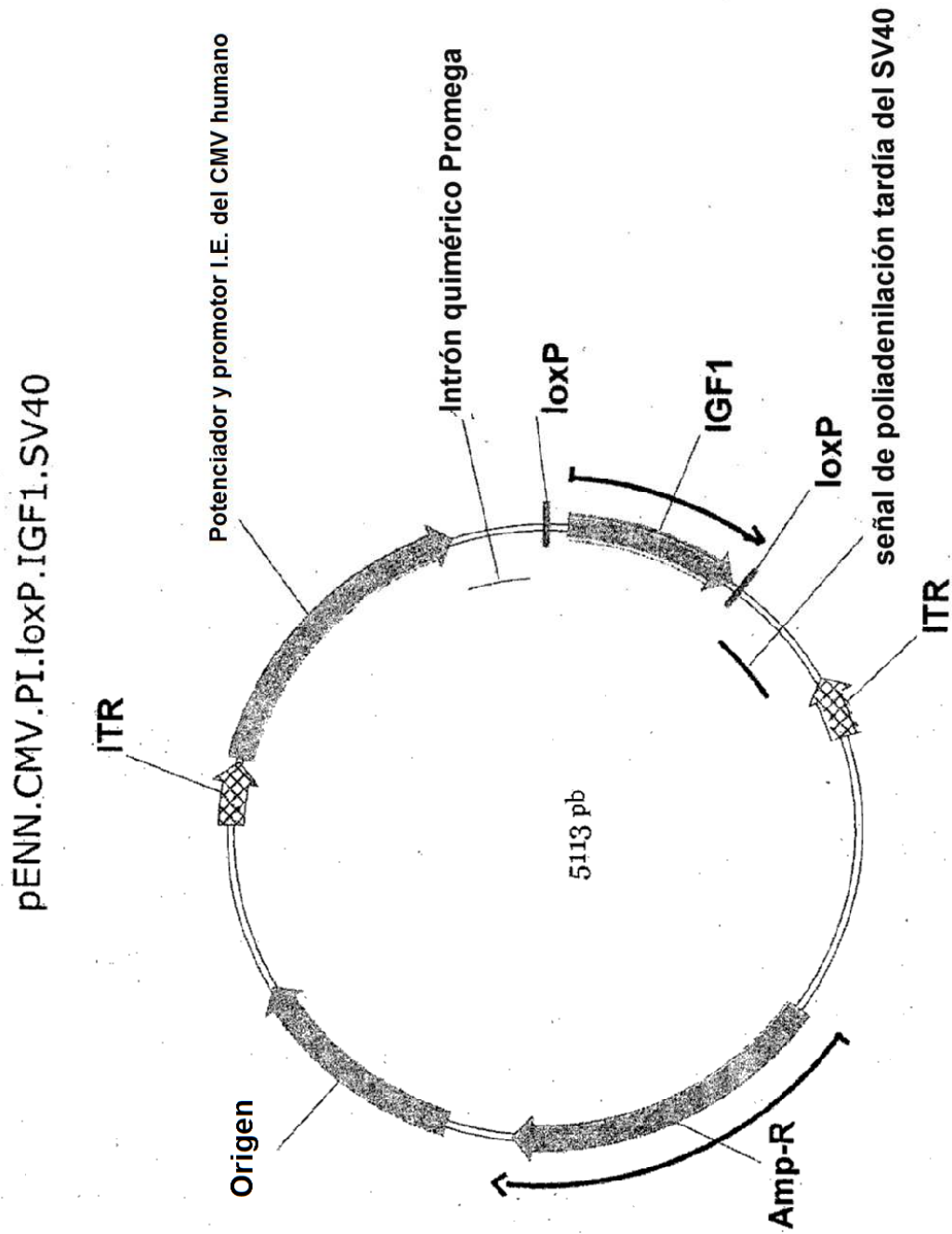


FIG. 14A

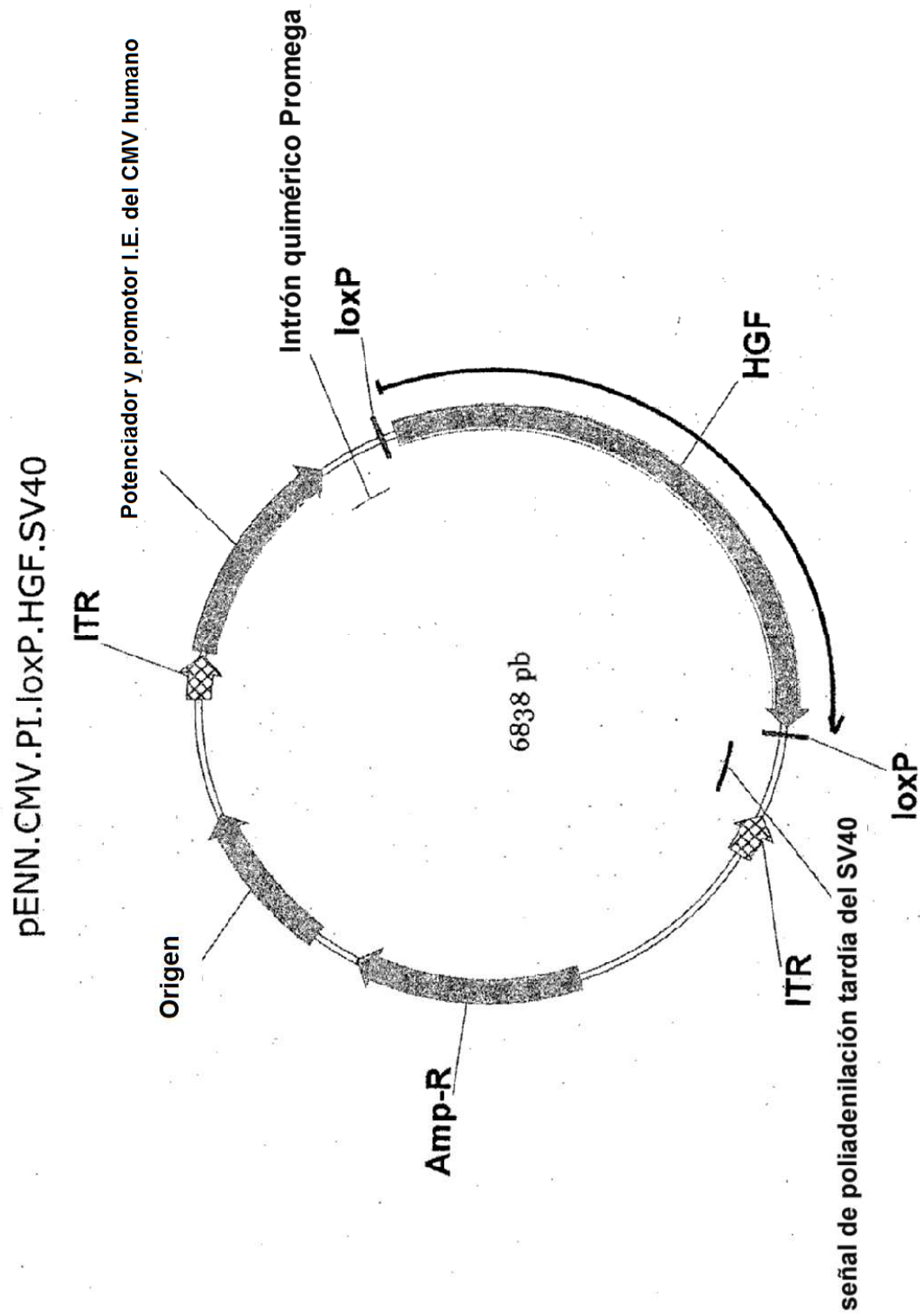


FIG. 14B

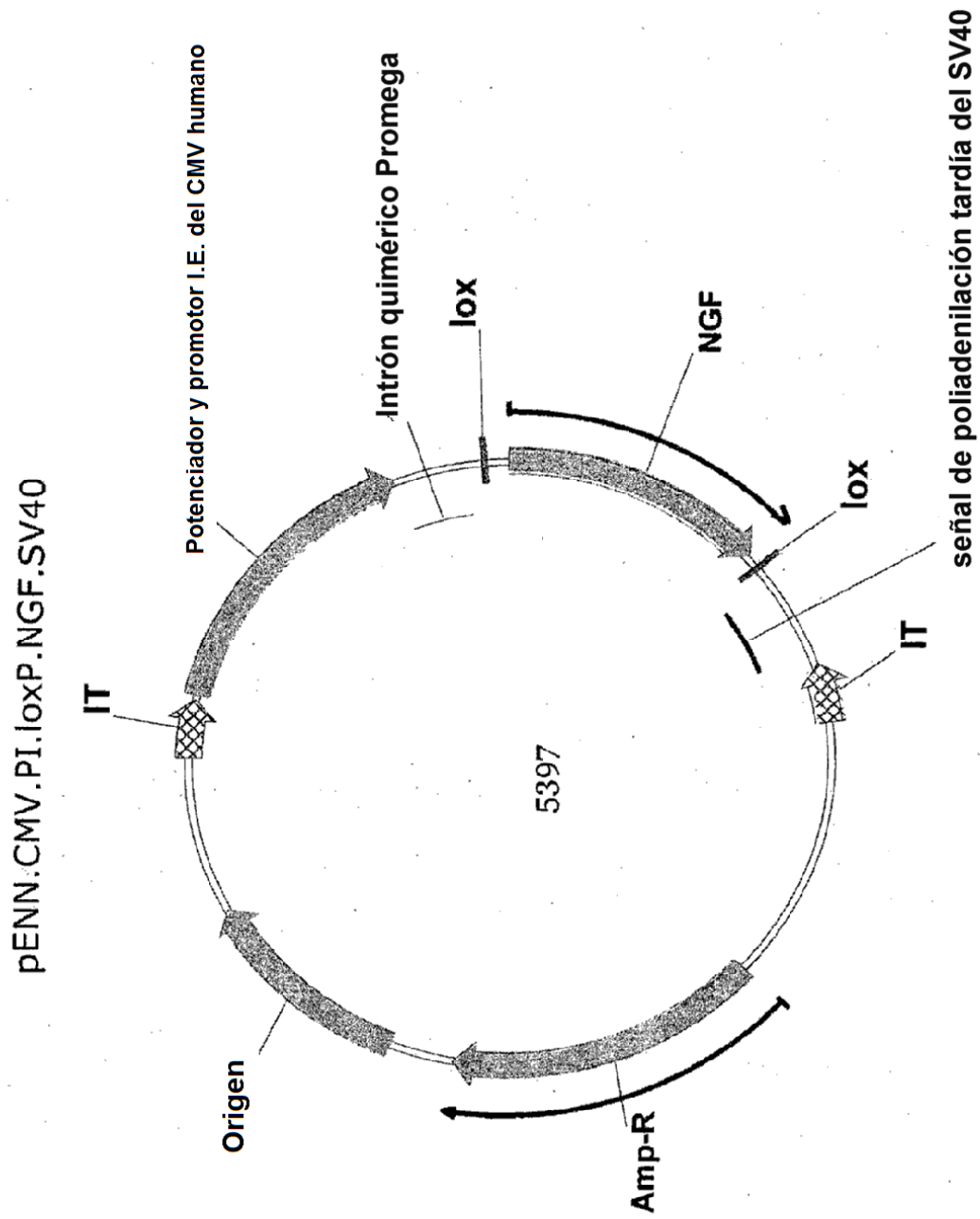


FIG. 15

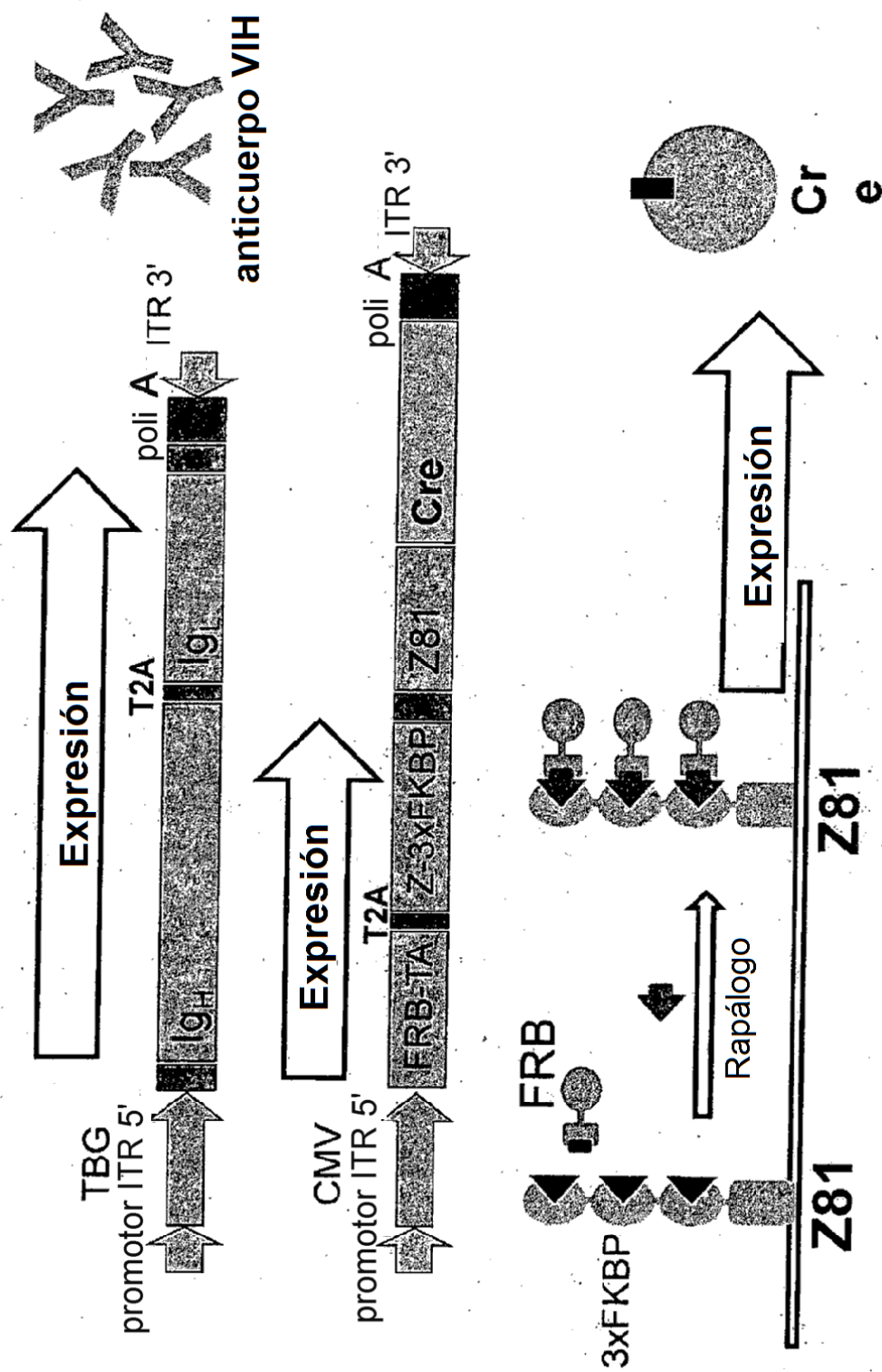


FIG. 16

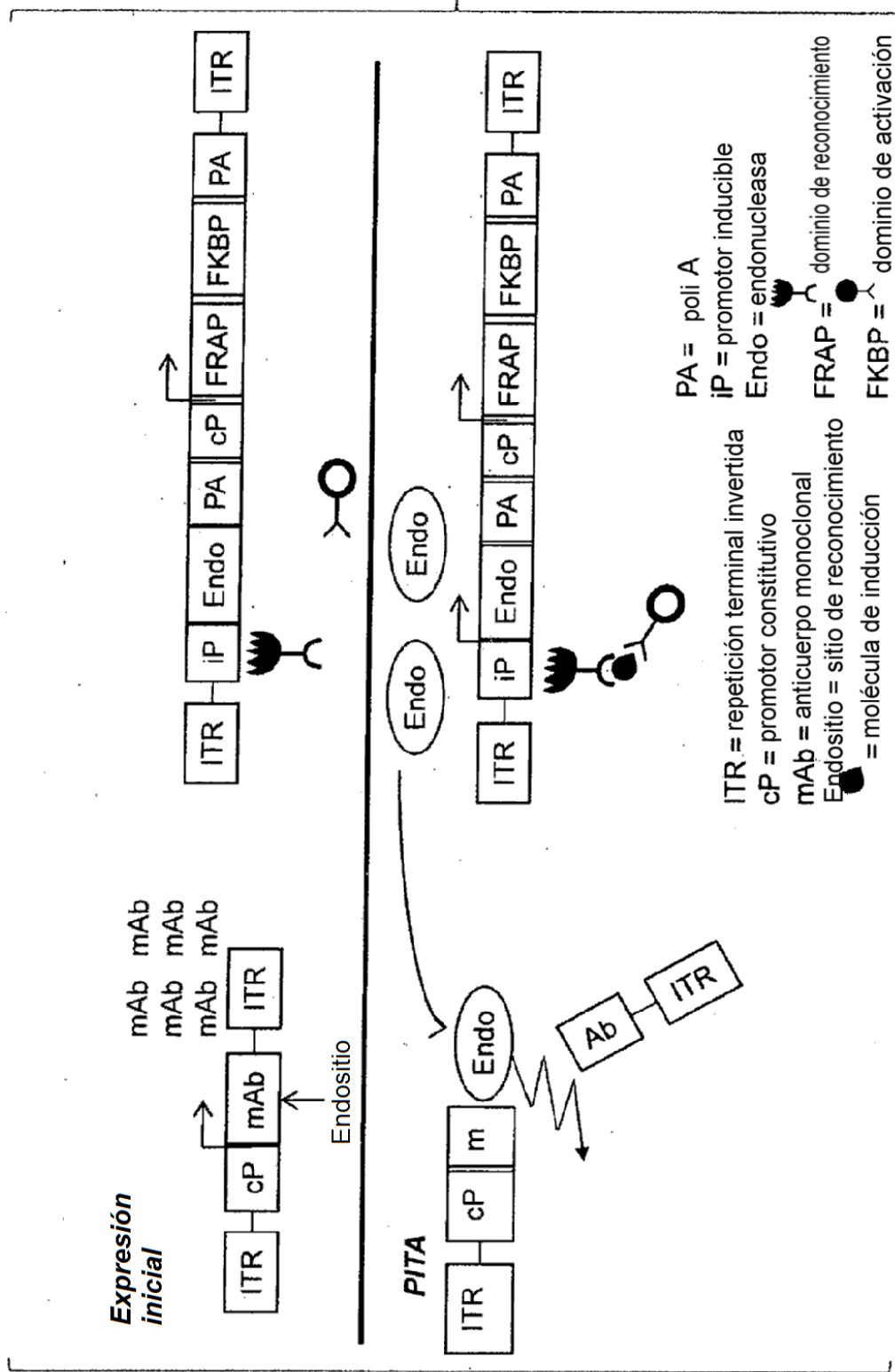


FIG. 17

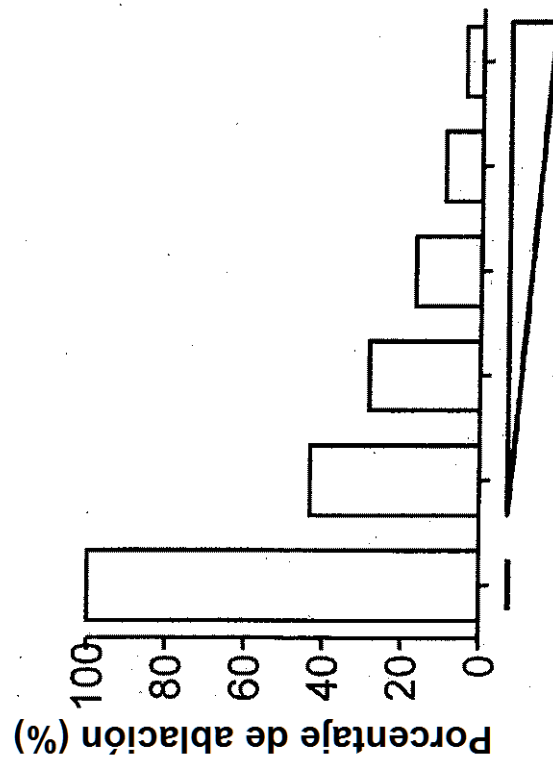


Fig. 18B

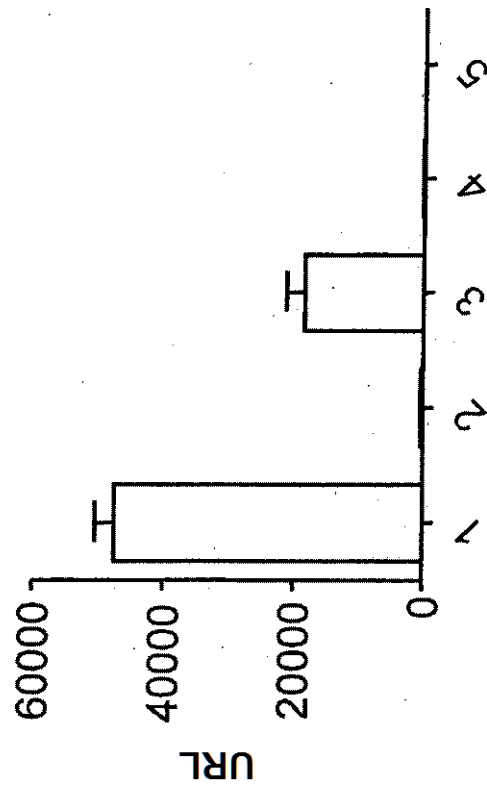


Fig. 18A

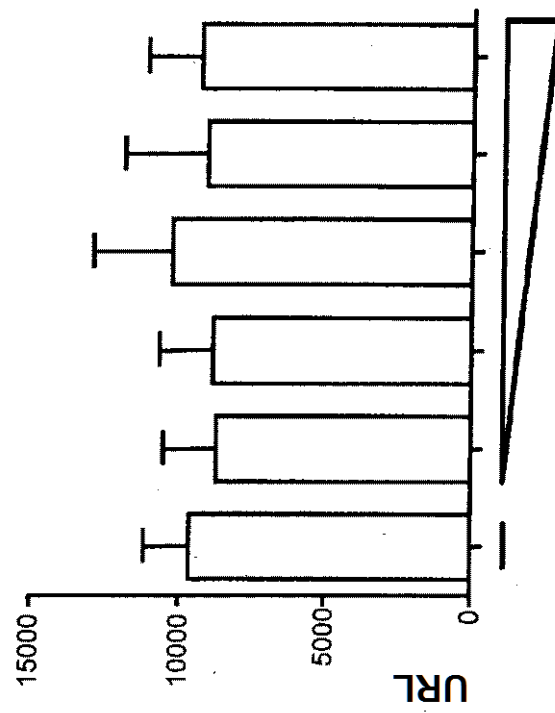


Fig. 19A

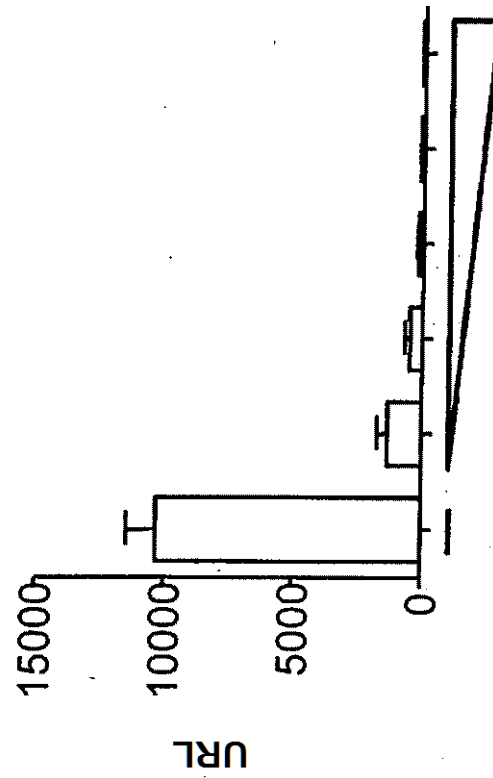


Fig. 19B

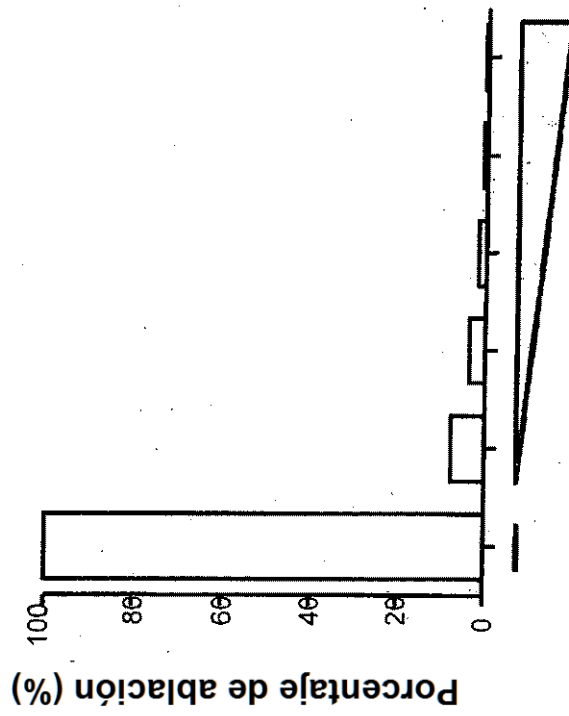


Fig. 20B

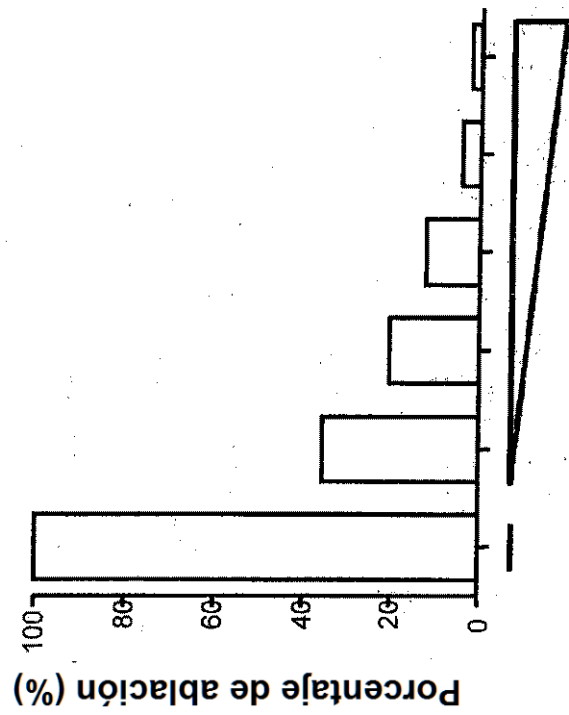


Fig. 20A

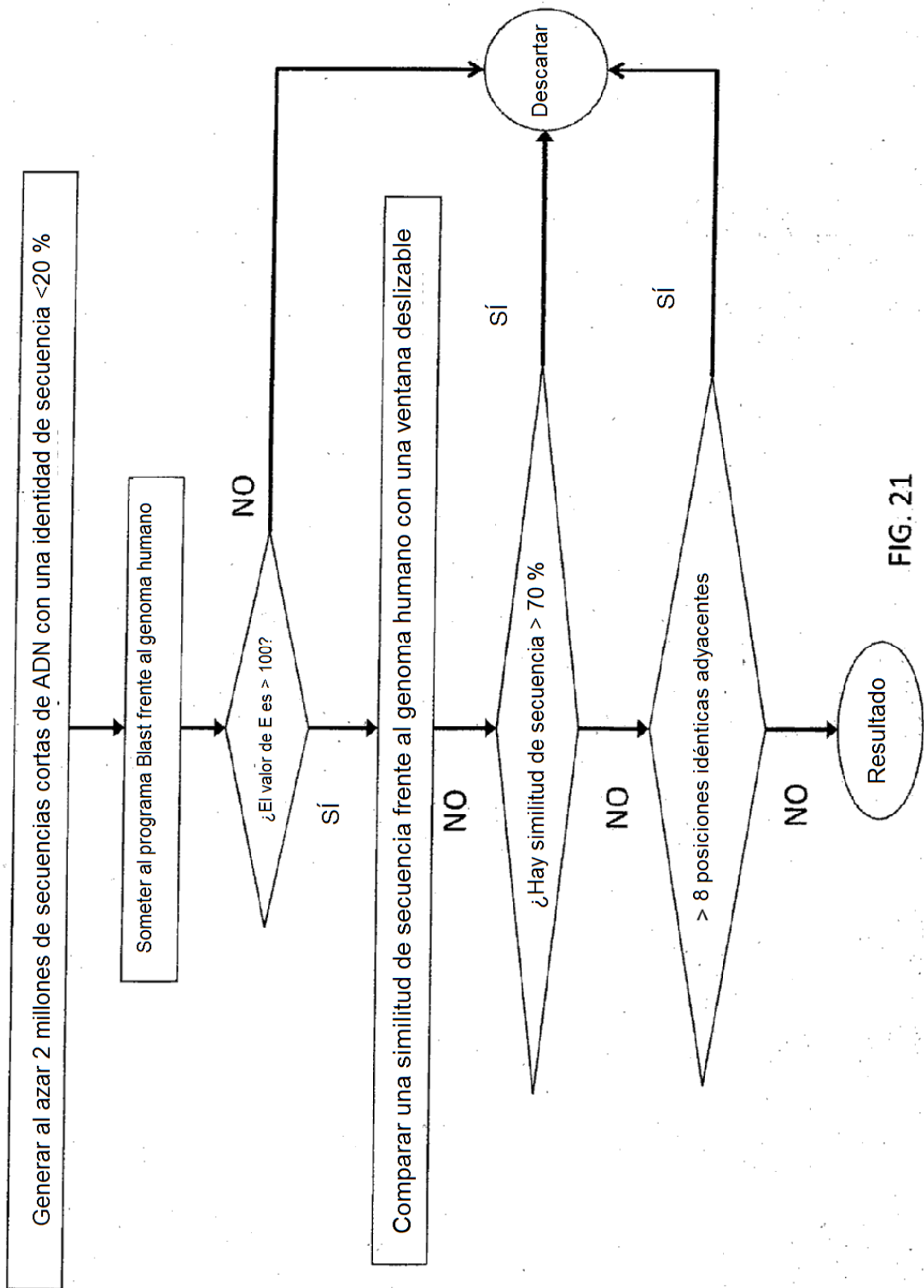


FIG. 21