

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 856**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2011 E 13188050 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2684890**

54 Título: **Procedimientos de conversión intracelular de proteínas de cadena sencilla a su forma bicatenaria**

30 Prioridad:

25.01.2010 US 286963 P

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

01.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 592 856 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

Procedimientos de conversión intracelular de proteínas de cadena sencilla a su forma bicatenaria.

- 5 La capacidad de las toxinas clostridiales, tales como, por ejemplo, las neurotoxinas botulínicas (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G, y la neurotoxina tetánica (TeNT), para inhibir la transmisión neuronal se han explotado en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase por ejemplo, William J. Lipham, *COSMETIC AND CLINICAL APPLICATIONS OF BOTULINUM TOXIN* (Slack, Inc., 2004). Las toxinas clostridiales disponibles comercialmente como composiciones farmacéuticas incluyen preparados de BoNT/A, tales como, por ejemplo, BOTOX[®] (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT[®]/RELOXIN[®], (Beaufour Ipsen, Porton Down, Inglaterra), NEURONOX[®] (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur) BTX-A (Lanzhou Institute Biological Products, China) y XEOMIN[®] (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania); y preparados de BoNT/B, tales como, por ejemplo, MYOBLOC[™]/NEUROBLOC[™] (Elan Pharmaceuticals, San Francisco, CA). Como un ejemplo, BOTOX[®] está aprobado actualmente en uno o más países para las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad adulta, fisura anal, dolor de espalda, blefarospasmo, bruxismo, distonía cervical, temblor esencial, líneas glabellares o líneas faciales hiperkinéticas, dolor de cabeza, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas nasolabiales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno nervioso VII.
- 10
- 15
- 20 La utilidad terapéutica de las toxinas clostridiales se ha expandido más allá de sus aplicaciones mio-relajantes actuales para tratar enfermedades basadas en nervio sensorial, tales como, por ejemplo, varias clases de dolor crónico, inflamación neurogénica y trastornos urogenitales, además de trastornos con base no neuronal, tales como, por ejemplo, pancreatitis. Un enfoque que se está explotando actualmente para expandir las terapias basadas en toxina clostridial implica modificar una toxina clostridial de manera que la toxina modificada tenga una capacidad de dirigirse a la célula alterada para una célula diana de toxina no clostridial. Esta capacidad redirigida se alcanza sustituyendo un dominio diana que se da de forma natural de una toxina clostridial con un dominio dirigido que muestra una actividad de unión selectiva por un receptor de toxina no clostridial presente en una célula diana de toxina no clostridial. Dichas modificaciones a un dominio diana dan como resultado una toxina modificada que es capaz de unirse de forma selectiva a un receptor de toxina no clostridial (receptor diana) presente en una célula diana de toxina no clostridial (redirigida). Una toxina clostridial redirigida con una actividad dirigida para una célula diana de toxina no clostridial puede unirse a un receptor presente en la célula diana de toxina no clostridial, translocarse en el citoplasma y ejercer su efecto proteolítico en el complejo SNARE de la célula diana de toxina no clostridial.
- 25
- 30
- 35 Ejemplos no limitantes de toxinas clostridiales redirigidas con una actividad dirigida para una célula diana de toxina no clostridial se describen en, por ejemplo, Keith A. Foster y col., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente de EE.UU. 5.989.545; Clifford C. Shone y col., *Recombinant Toxin Fragments*, patente de EE.UU. 6.461.617; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente de EE.UU. 6.500.436; Conrad P. Quinn y col., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, patente de EE.UU. 6.632.440; Lance E. Steward y col., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, patente de EE.UU. 6.843.998; J. Oliver Dolly y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, patente de EE.UU. 7.419.676; Lance E. Steward y col., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, patente de EE.UU. 7.514.088; Keith A. Foster y col., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, Publicación de patente de EE.UU. 2003/0180289; y Keith A. Foster y col., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2005/023309. La capacidad para redirigir los efectos terapéuticos asociados con las toxinas clostridiales ha extendido enormemente el número de aplicaciones medicinales capaces de usar una terapia de toxina clostridial. Como un ejemplo no limitante, las toxinas clostridiales modificadas redirigidas a neuronas sensoras son útiles en el tratamiento de varias clases de dolor crónico, tales como, por ejemplo, hiperalgesia y alodinia, dolor neuropático y dolor inflamatorio, véase, por ejemplo, Foster, anteriormente, (1999); y Donovan, anteriormente, (2002); y Stephan Donovan, *Method For Treating Neurogenic Inflammation Pain with Botulinum Toxin and Substance P Components*, patente de EE.UU. 7.022.329. Como otro ejemplo no limitante, las toxinas clostridiales modificadas redirigidas a células pancreáticas son útiles en el tratamiento de pancreatitis, véase, por ejemplo, Steward, anteriormente, (2005).
- 40
- 45
- 50
- 55 Las toxinas clostridiales, bien de forma natural o bien de forma modificada, se procesan en una forma bicatenaria para alcanzar la actividad total. Las toxinas clostridiales que se dan de forma natural se traducen cada una como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que se escinde posteriormente por escisión proteolítica en un bucle disulfuro mediante una proteasa que se da de forma natural (FIG. 1). Esta escisión se da en la región de bucle bicatenario discreta creada entre dos residuos cisteína que forman un puente disulfuro. Este procesado post-traducciona da una molécula bicatenaria que comprende una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa (CL), que comprende el dominio enzimático, y una cadena pesada de aproximadamente 100 kDa (CP), que comprende los dominios de translocación y unión celular, manteniéndose la CL y la CP juntas mediante el enlace disulfuro sencillo e interacciones no covalentes (FIG. 1). Las toxinas clostridiales producidas de forma recombinante sustituyen generalmente el sitio de escisión de proteasa del bucle bicatenario que se da de forma natural con un sitio de escisión de proteasa exógena (FIG. 2). Véase, por ejemplo, Dolly, J. O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, patente de EE.UU. 7.419.676. Aunque las toxinas clostridiales redirigidas varían en su peso molecular total por el tamaño del
- 60
- 65

resto dirigido, el proceso de activación y su dependencia de los sitios de escisión exógenos es esencialmente el mismo que el de las toxinas clostridiales producidas de forma recombinante. Véase, por ejemplo, Steward, L. E. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, publicación de patente de EE.UU. 2009/0005313; Steward, L. E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente de EE.UU. 111776.075; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells*, publicación de patente de EE.UU. 2008/0241881.

Hasta la fecha, la conversión de la forma de cadena sencilla de una toxina clostridial producida de forma recombinante o toxina clostridial modificada en su forma bicatenaria requirió un proceso de activación *in vitro*. En primer lugar, las células bacterianas usadas para producir de forma recombinante estas toxinas carecen de la proteasa que se da de forma natural presente en las cepas clostridiales que producen las toxinas nativas. En segundo lugar, no ha habido gran necesidad de que las células bacterianas produzcan toxinas activadas de forma recombinante por problemas de seguridad surgidos en el manejo de toxinas activadas. Véase, por ejemplo, Dolly, U.S. 7.419.676, anteriormente, (2008). Sin embargo, si estos problemas pudieran superarse, la producción de toxinas activadas producidas de forma recombinante modernizarían el proceso de fabricación de toxinas clostridiales producidas de forma recombinante o toxinas clostridiales modificadas. Por ejemplo, actualmente la fabricación de toxinas clostridiales producidas de forma recombinante o toxinas clostridiales modificadas implica las siguientes etapas de purificación: 1) cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, 2) diálisis de intercambio de tampón, 3) reacción de escisión de proteasa, 4), cromatografía de intercambio iónico y 5) adición de PEG y congelación rápida por almacenamiento a -80°C. El uso de una célula bacteriana que puede escindir proteolíticamente la toxina clostridial recombinante de forma intracelular mientras está aún expresando la toxina puede reducir el número de etapas de purificación a las siguientes: 1) cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, 2) diálisis de intercambio de tampón, 3) cromatografía de intercambio iónico y 4) adición de PEG y congelación rápida por almacenamiento a -80°C. El documento US 2004/018589 describe un procedimiento intracelular para convertir una toxina clostridial de cadena sencilla que comprende una región de bucle bicatenario en una forma bicatenaria que comprende la etapa de hacer crecer una célula E. coli que comprende una construcción con un MLA que codifica una toxina clostridial de cadena sencilla que tiene entre otros un sitio de escisión de proteasa Factor Xa, junto con una construcción que comprende un MLA que codifica una proteasa Factor Xa.

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

Así, aspectos de la presente memoria proporcionan una construcción de expresión dual que incluye un marco de lectura abierto que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y un marco de lectura abierto que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situada en la región de bucle bicatenario. En aspectos adicionales, la proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser, por ejemplo, una toxina clostridial que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, una toxina clostridial modificada que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena, o una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de toxina no clostridial, y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. Los polinucleótidos, además de las toxinas clostridiales que comprenden una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena que codifican, se describen en, por ejemplo, Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, patente de EE.UU. 7.132.259; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, patente de EE.UU. 7.419.676. Los polinucleótidos, además de las proteínas que comprenden un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de toxina no clostridial y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena que codifican, se describen en, por ejemplo, Steward, L.E. y col., *Multivalent Clostridial Toxins*, publicación de patente de EE.UU. 2009/0048431; Steward, L.E. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, publicación de patente de EE.UU. 2009/0069238; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente de EE.UU. 111776.075; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, publicación de patente de EE.UU. 20D810241881; Foster, K.A. y col., *Fusion Proteins*, publicación de patente de EE.UU. 2009/0035822; Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente de EE.UU. 2009/0162341; Steward, L.E. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, publicación de patente de EE.UU. 2008/0032931; Foster, K.A. y col., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente de EE.UU. 2008/0187960; Steward, L.E. y col., *Degradable Clostridial Toxins*, publicación de patente de EE.UU. 2008/0213830; Steward, L.E. y col., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells*, publicación de patente de EE.UU. 2008/0241881; Dolly, J.O. y col., *Activatable Clostridial Toxins*, patente de EE.UU. 7.419.676; y una solicitud de patente complementaria de Ghanshani, y col., *Modified Clostridial Toxins Comprising an Integrated Protease Cleavage Site-Binding Domain*, número de expediente. 18468 PROV (BOT).

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

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

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

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

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

Otros aspectos más de la presente memoria proporcionan un procedimiento intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a 37 °C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas, comprendiendo la construcción de expresión dual; i) un marco de lectura abierto que codifica una proteína de cadena sencilla, comprendiendo la proteína de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión de toxina no clostridial y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV; y ii) un marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 12 a aproximadamente 16 °C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en el que el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de la construcción de expresión dual; y en el que la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de la proteasa TEV situada en la región de bucle bicatenario, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria.

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

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

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

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

Otros aspectos más de la presente memoria proporcionan un procedimiento intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) hacer crecer una célula que comprende i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteasa que puede escindir proteolíticamente el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle bicatenario de una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; b) hacer crecer la célula a una segunda temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima inducción de expresión de proteína a partir del marco de lectura abierto que

codifica la proteína de cadena sencilla, en el que el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa a partir de las construcciones de expresión; y en el que la proteasa producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle bicatenario, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria.

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

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

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

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

60 Aspectos aún adicionales de la presente memoria proporcionan un procedimiento intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) hacer crecer a 37 °C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas una célula, comprendiendo la célula i) una construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende un dominio enzimático, un dominio de translocación y un dominio de unión de toxina no clostridial y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV y ii) otra construcción de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica la proteasa TEV; b) hacer crecer la célula a aproximadamente 20 a aproximadamente 24 °C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas, en el que el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa TEV a partir de

las construcciones de expresión; y en el que la proteasa TEV producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de la proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión TEV integrado, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria.

5 **Breve descripción de los dibujos**

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

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

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

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

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

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

BoNT/D	4	M1-R445	D446-N862	S863-E1276
BoNT/E	5	M1-R422	K423-K845	R846-K1252
BoNT/F	6	M1-K439	A440-K864	K865-E1274
BoNT/G	7	M1-K446	S447-S863	N864-E1297
TeNT	8	M1-A457	S458-V879	I880-D1315
BaNT	9	M1-K431	N432-I857	I858-E1268
BuNT	10	M1-R422	K423-I847	K848-K1251

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplos de dichas toxinas clostridiales que comprenden una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena se describen en, por ejemplo, J. Oliver Dolly, y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, patente de EE.UU. 7.132.529; J. Oliver Dolly, y col., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, patente de EE.UU. 7.419.676; Lance Steward, y col., *Leucine-Based Motifs and Clostridial Neurotoxins*, patente de EE.UU. 6.903.187; Lance Steward, y col., *Leucine-Based Motifs and Clostridial Neurotoxins*, patente de EE.UU. 7.393.925;

Wei-Jen Lin, y col., *Neurotoxins with Enhanced Target Specificity*, patente de EE.UU. 7.273.722; Lance Steward, y col., *Modified Botulinum Neurotoxins*, patente de EE.UU. 7.491.799; Lance E. Steward, y col., *Optimized Expression of Active Botulinum Toxin Type E*, publicación de patente de EE.UU. 200810138893; Ester Fernández-Salas, y col., *Optimized Expression of Active Botulinum Toxin Type A*, publicación de patente de EE.UU. 2008/0057575.

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

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

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

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

65

En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierto que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a péptido intestinal vasoactivo (VIP) y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierto que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a VIP1 y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena; o 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a VIP2 y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena.

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

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

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

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

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

toxina clostridial, un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado y un dominio enzimático de toxina clostridial; 5) un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio enzimático de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado; y 6) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de proteasa integrado.

En otros aspectos de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierto que codifica un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión opioide al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado. En aspectos adicionales de esta realización, una construcción de expresión comprende un marco de lectura abierto que codifica 1) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a encefalina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; 2) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión adrenomedular bovina-22 (BAM22) al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; 3) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a endomorfinina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; 4) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a endorfina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; 5) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a dinorfina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; 6) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a nociceptina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; 7) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a hemorfina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado; u 8) un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a rimorfina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado.

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

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

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

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

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

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

En otro aspecto de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C es SEQ ID NO: 12. En otro aspecto más de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C es una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una isoforma de proteasa de rinovirus humano 3C. En otro aspecto más de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C es una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que no se da de forma natural, tal como, por ejemplo, una variante de proteasa de rinovirus humano 3C conservativo, una variante de proteasa de rinovirus humano 3C no conservativo, una proteasa de rinovirus humano 3C quimérica, un fragmento de proteasa de rinovirus humano 3C activo o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto de esta realización, una proteasa de rinovirus humano 3C, una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que se da de forma natural, o una variante de proteasa de rinovirus humano 3C que no se da de forma natural se obtiene de una especie de rinovirus.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

polipéptido que tiene, por ejemplo, supresiones, adiciones y/o sustituciones de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25; o supresiones, adiciones y/o sustituciones de como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos respecto a SEQ ID NO: 25 o aminoácidos 107-365 de SEQ IS NO: 25.

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

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

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

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

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

60 En un aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierto que codifica una toxina clostridial que incluye una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV y otro marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV. En otro aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierto que codifica una toxina clostridial que incluye un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión a toxina clostridial y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV y otro marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV. En otro aspecto más de esta realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierto que codifica una toxina clostridial que incluye un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina

clostridial, un dominio de unión a toxina clostridial, una región de bucle bicatenario y un sitio de escisión de la proteasa TEV, en el que el sitio de escisión de la proteasa TEV está situado en la región de bucle bicatenario y otro marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV.

5 En un aspecto de esta realización, una construcción de expresión dual comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de toxina no clostridial, una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena y otro marco de lectura abierto que codifica una proteasa que puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógena situado en la región de bucle bicatenario. En otro aspecto de esta
10 realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierto que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de toxina no clostridial y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV y otro marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV. En otro aspecto más de esta
15 realización, una construcción de expresión dual puede comprender un marco de lectura abierto que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión de toxina no clostridial, una región de bucle bicatenario y un sitio de escisión de la proteasa TEV, en el que el sitio de escisión de la proteasa TEV está situado en la región de bucle bicatenario y otro marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV.

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

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

Así, en una realización, el marco de lectura abierto que codifica una proteasa está bajo el control de la primera
45 región promotora mientras el marco de lectura abierto que codifica una proteína que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En un aspecto de esta realización, el marco de lectura abierto que
50 codifica una proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierto que codifica una toxina clostridial que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV situado en la región de bucle bicatenario está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En otro aspecto de esta realización, el marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierto que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de
55 toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial, un dominio de unión al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor.

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

clostridial, y una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor. En otro aspecto más de esta realización, el marco de lectura abierto que codifica una proteína que comprende un dominio enzimático de toxina clostridial, un dominio de translocación de toxina clostridial y un dominio de unión al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado está bajo el control de la primera región promotora mientras el marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV está bajo el control de las regiones tanto del primer promotor como del segundo promotor.

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

Los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, una proteína que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de proteasa exógena. Como se usa en esta memoria, el término "región de bucle bicatenario" significa la secuencia de aminoácidos de una toxina clostridial que contiene un sitio de escisión de proteasa usado para convertir la forma de cadena sencilla de una toxina clostridial en la forma bicatenaria. Ejemplos no limitantes de una región de bucle bicatenario de toxina clostridial, incluyen, una región de bucle bicatenario de BoNT/A que comprende aminoácidos 430-454 de SEQ ID NO: 1; una región de bucle bicatenario de BoNT/B que comprende aminoácidos 437-446 de SEQ ID NO: 2; una región de bucle bicatenario de BoNT/C1 que comprende aminoácidos 437-453 de SEQ ID NO: 3; una región de bucle bicatenario de BoNT/D que comprende aminoácidos 437-450 de SEQ ID NO: 4; una región de bucle bicatenario de BoNT/E que comprende aminoácidos 412-426 de SEQ ID NO: 5; una región de bucle bicatenario de BoNT/F que comprende aminoácidos 429-445 de SEQ ID NO: 6; una región de bucle bicatenario de BoNT/G que comprende aminoácidos 436-450 de SEQ ID NO: 7; una región de bucle bicatenario de TeNT que comprende aminoácidos 439-467 de SEQ ID NO: 8; una región de bucle bicatenario de BaNT que comprende aminoácidos 421-435 de SEQ ID NO: 9; y una región de bucle bicatenario de BuNT que comprende aminoácidos 412-426 de SEQ ID NO: 10 (Tabla 2).

Tabla 2. Región de bucle bicatenario de toxinas clostridiales

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

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

Como se ha mencionado anteriormente, las toxinas clostridiales se traducen como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa que se escinde posteriormente por escisión proteolítica en un bucle disulfuro mediante una proteasa que se da de forma natural. Este procesado post-traducciona da una molécula bicatenaria que comprende una cadena ligera de aproximadamente 50 kDa (CL) y una cadena pesada (CP) de aproximadamente 100 kDa unidas mediante un enlace disulfuro sencillo e interacciones no covalentes. Mientras la identidad de la proteasa se desconoce normalmente, el sitio de escisión de proteasa del bucle bicatenario para muchas toxinas clostridiales se ha determinado. En BoNTs, la escisión en K448-A449 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/A en la forma bicatenaria; la escisión en K441-A442 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/B en la forma bicatenaria; la escisión en K449-T450 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/C1 en la forma bicatenaria; la escisión en R445-D446 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/D en la forma bicatenaria; la escisión en R422-K423 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/E en la forma

bicatenaria; la escisión en K439-A440 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/F en la forma bicatenaria; y la escisión en K446-S447 convierte la forma polipeptídica sencilla de BoNT/G en la forma bicatenaria. La escisión proteolítica de la forma polipeptídica sencilla de TeNT a A457-S458 da como resultado la forma bicatenaria. La escisión proteolítica de la forma polipeptídica sencilla de BaNT a K431-N432 da como resultado la forma bicatenaria. La escisión proteolítica de la forma polipeptídica sencilla de BuNT a R422-K423 da como resultado la forma bicatenaria. Dicho sitio de escisión de proteasa de bucle bicatenario está unido de forma operable en el marco a una toxina clostridial modificada como una proteína de fusión. Sin embargo, debería indicarse también que los sitios de escisión adicionales en el bucle bicatenario también parecen escindirse dando como resultado la generación de un pequeño fragmento peptídico que se pierde. Como un ejemplo no limitante, la escisión de un polipéptido de cadena sencilla BoNT/A da como resultado en última instancia la pérdida de un fragmento de diez aminoácidos en el bucle bicatenario.

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

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

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

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

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

En otro aspecto de esta realización, una región de bucle bicatenario comprende un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco que tiene la secuencia de consenso P6-P5-V-R-F-Q*-G (SEQ ID NO: 39) o P6-P5-V-R-F-Q*-S (SEQ ID NO: 40), en el que P5 y P6 pueden ser cualquier aminoácido. En otros aspectos de la realización, una región de bucle bicatenario comprende un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco que comprende SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44. En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco está situado en el bucle bicatenario de, por ejemplo, un BoNT/A, un BoNT/B, un BoNT/C1, un BoNT/D, un BoNT/E, un BoNT/F, un BoNT/G, un TeNT, un BaNT o un BuNT. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa de virus de moteado de las venas del tabaco está situado en el bucle bicatenario de una proteína descrita en, por ejemplo, patente de EE.UU. 5.989.545; patente de EE.UU. 6.461.617; patente de EE.UU. 6.632.440; patente de EE.UU. 6.843.998; patente de EE.UU. 7.244.437; patente de EE.UU. 7.413.742 y patente de EE.UU. 7.425.338.

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

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

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

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

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

bucle bicatenario endógeno con un sitio de escisión de proteasa exógena puede ser la adición de un sitio exógeno en la que el sitio exógeno se construye en una posición diferente de la posición del sitio de escisión del sitio endógeno, construyéndose el sitio endógeno para ser inoperable.

- 5 Un sitio de escisión de proteasa que se da de forma natural contenido en la región de bucle bicatenario pueden hacerse inoperable alterando al menos los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante la proteasa de bucle bicatenario que se da de forma natural. Pueden hacerse alteraciones más extensas, con la condición de que los dos residuos de cisteína de la región del bucle bicatenario permanezcan intactos y la región pueda aún formar un puente disulfuro. Ejemplos no limitantes de una alteración de aminoácidos incluyen la supresión de un aminoácido o la sustitución del aminoácido original con un aminoácido diferente. Así, en una realización, un sitio de escisión de proteasa que se da de forma natural contenido en la región de bucle bicatenario se hace inoperable alterando los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural. En otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa que se da naturalmente contenido en la región del bucle bicatenario se hace inoperable alterando, por ejemplo, al menos tres aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido por una proteasa que se da de forma natural; al menos cuatro aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos cinco aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos seis aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos siete aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos ocho aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos nueve aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos diez aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; al menos 15 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; o al menos 20 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30 En aún otros aspectos de esta realización, un sitio de escisión de proteasa bicatenario que se da de forma natural contenido en la región del bucle bicatenario se hace inoperable alterando, por ejemplo, como mucho tres aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho cuatro aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho cinco aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho seis aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho siete aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho ocho aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho nueve aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho diez aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; como mucho 15 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural; o como mucho 20 aminoácidos que incluyen los dos aminoácidos que flanquean el enlace peptídico escindido mediante una proteasa que se da de forma natural.
- 35
- 40
- 45

Los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen, en parte, una célula. Se concibe que cualquiera y todas las células puedan usarse. Así, aspectos de esta realización incluyen, sin limitación, células procarióticas que incluyen, sin limitación, cepas de células bacterianas aeróbicas, microaerofílicas, capnofílicas, facultativas, anaeróbicas, gramnegativas y grampositivas como las derivadas de, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile*, *Caulobacter crescentus*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella typhimurium*; y células eucarióticas que incluyen, sin limitación, cepas de levadura, tal como, por ejemplo, las derivadas de *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*; células de insecto y líneas celulares derivadas de insectos, tales como, por ejemplo, las derivadas de *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* y *Manduca sexta*; y células de mamífero y líneas celulares derivadas de células de mamífero, tal como, por ejemplo, las derivadas de ratón, rata, hámster, porcinas, bovinas, equinas, de primate y de ser humano. Las líneas celulares pueden obtenerse a partir de la Colección de Cultivo Tipo Americano, Colección Europea de Cultivos Celulares y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares. Ejemplos no limitantes de protocolos específicos para seleccionar, fabricar y usar una línea celular apropiada se describen en por ejemplo, *Insect Cell Culture Engineering* (Mattheus F. A. Goosen y col. eds., Marcel Dekker, 1993); *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects* (J. M. Vlák y col. eds., Kluwer Academic Publishers, 1996); Maureen A. Harrison e Ian F. Rae, *General Techniques of Cell Culture* (Cambridge University Press, 1997); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (Alan Doyle et al eds., John Wiley and Sons, 1998); R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (Wiley-Liss, 4ª ed. 2000); *Animal Cell Culture: A Practical Approach* (John R. W. Masters ed., Oxford University Press, 3ª

50

55

60

65

ed. 2000); *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, citado anteriormente, (2001); *Basic Cell Culture: A Practical Approach* (John M. Davis, Oxford Press, 2ª ed. 2002); y *Current Protocols in Molecular Biology*, citado anteriormente, (2004). Estos protocolos son procedimientos rutinarios en el alcance de un experto en la técnica y a partir de la enseñanza en esta memoria.

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

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

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

En otro aspecto de esta realización, un procedimiento mediado por virus, denominado transducción, se usa para introducir una construcción de expresión o una construcción de expresión dual descrita en la presente memoria en una célula. En procedimientos mediados por virus de transducción temporal, el proceso por el que las partículas virales infectan y replican en una célula huésped se ha manipulado para usar este mecanismo para introducir la construcción de expresión o construcción de expresión dual en la célula. Los procedimientos mediados por virus se han desarrollado a partir de una amplia variedad de virus que incluyen, sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus simple del herpes, picornavirus, alfavirus y baculovirus, véase, por ejemplo, Armin Blesch, *Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer*, 33(2) *Methods* 164-172 (2004); y Maurizio Federico, *From lentiviruses to lentivirus vectors*, 229 *Methods Mol. Biol.* 3-15 (2003); E. M. Poeschla, *Non-primate lentiviral vectors*, 5(5) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 529-540 (2003); Karim Benihoud y col., *Adenovirus vectors for*

5 *gene delivery*, 10(5) *Curr. Opin. Biotechnol.* 440-447 (1999); H. Bueler, *Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy*, 380(6) *Biol. Chem.* 613-622 (1999); Chooi M. Lai y col., *Adenovirus and adeno-associated virus vectors*, 21(12) *DNA Cell Biol.* 895-913 (2002); Edward A. Burton y col., *Gene delivery using herpes simplex virus vectors*, 21(12) *DNA Cell Biol.* 915-936 (2002); Paola Grandi y col., *Targeting HSV amplicon vectors*, 33(2) Methods 179-186 (2004); Ilya Frolov y col., *Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications*, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Markus U. Ehrenguber, *Alphaviral gene transfer in neurobiology*, 59(1) *Brain Res. Bull.* 13-22 (2002); Thomas A. Kost y J. Patrick Condreay, *Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors*, 20(4) *Trends Biotechnol.* 173-180 (2002); y A. Huser y C. Hofmann, *Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications*, 3(1) *Am. J. Pharmacogenomics* 53-63 (2003).

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

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

55 Los vectores retrovirales y protocolos específicos para cómo usar dichos vectores se describen en, por ejemplo, Manfred Gossen y Hermann Bujard, *Tight control of gene expression in eukaryotic cells by tetracycline-responsive promoters*, patente de EE. UU. 5.464.758, Hermann Bujard y Manfred Gossen, *Methods for regulating gene expression*, patente de EE.UU. 5.814.618, David S. Hogness, *Polynucleotides encoding insect steroid hormone receptor polypeptides and cells transformed with same*, patente de EE.UU. 5.514.578, y David S. Hogness, *Polynucleotide encoding insect ecdysone receptor*, patente de EE.UU. 6.245.531; Elisabetta Vegeto y col., *Progesterone receptor having C. terminal hormone binding domain truncations*, patente de EE.UU. 5.364.791, Elisabetta Vegeto y col., *Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy*, patente de EE.UU. 5.874.534, y Elisabetta Vegeto y col., *Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy*, patente de EE.UU. 5.935.934. Además, dichos sistemas de reparto viral pueden prepararse por procedimientos estándar y están disponibles comercialmente, véase, por ejemplo, Sistemas de Expresión Génica BD™ Tet-Off y Tet-On (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA) y Manual de Usuario de Sistemas de Expresión Génica BD™ Tet-Off and Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (14 de Mar., 2003), Sistema GENESWITCH™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y Sistema GENESWITCH™ Un Sistema de

Expresión Regulado por Mifepristona para Células de Mamífero versión D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 de Nov., 2002); Sistema de Expresión Lentiviral VIRAPOWERTM (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y Manual de Instrucción del Sistema de Expresión Lentiviral VIRAPOWERTM 25-0501 versión E, Invitrogen, Inc., (8 de Dic., 2003); y Sistema de Expresión de Mamífero Inducible por Retrovirus COMPLETE CONTROL® (Stratagene, La Jolla, CA) y Manual de Instrucción del Sistema de Expresión de Mamíferos Inducible por Retrovirus COMPLETE CONTROL®, 064005e.

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

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

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

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

En una realización, una célula se hace crecer a una primera temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la máxima densidad celular. En aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1,0 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,0 horas, aproximadamente 3,0 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,0 horas, aproximadamente 5,0 horas, aproximadamente 6,0 horas, aproximadamente 7,0 horas, aproximadamente 8,0 horas, aproximadamente 9,0 horas o aproximadamente 10 horas. En otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 42 °C durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1,0 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,0 horas, aproximadamente 3,0 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,0 horas, aproximadamente 5,0 horas. En aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1,0 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2,0 horas, aproximadamente 3,0 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4,0 horas o aproximadamente 5,0 horas. En aún otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 12 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, a aproximadamente 16 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, a aproximadamente 20 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, o a aproximadamente 24 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas. En aún otros aspectos de esta realización, una célula se hace crecer a aproximadamente 12 °C a aproximadamente 16 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, o a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 24 °C durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas.

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Variantes de la proteasa TEV

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

A. Construcción de construcciones de expresión pET29ITEV.

Para producir una proteasa TEV de forma recombinante, se sintetizó un marco de lectura abierto que codifica la proteasa TEV deseada usando procedimientos estándar (BlueHeron Biotechnology, Bothell, WA). Se sintetizaron oligonucleótidos complementarios de 20 a 50 bases de longitud, que abarcan el marco de lectura abierto entero, usando síntesis de fosforamidita estándar. Estos oligonucleótidos se hibridaron en dobletes de doble hebra que se ligaron secuencialmente juntos para montar la molécula de polinucleótido de longitud total. Esta molécula de polinucleótido se clonó usando procedimientos de biología molecular estándar en un vector vehículo pUCBHB1 en el sitio *SmaI* para generar plásmidos pUCBHB1/TEV. La molécula de polinucleótido sintetizada se verificó por secuenciación usando BIG DYE TERMINATOR™ Química 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los marcos de lectura abiertos que codifican las variantes TEV se optimizaron con codones para la expresión de *E. coli* y todos codifican un fragmento proteolítico de aproximadamente 250 aminoácidos de aproximadamente 27,5 kDa, que corresponden a los residuos 2038-2279 de la poliproteína TEV de longitud completa condensada a un marcador de purificación por afinidad de polihistidina tanto N como C terminal. La expresión recombinante de la proteasa TEV de tipo silvestre da como resultado una proteína que tiene una propensión para escindirse a sí misma en la serina 219 para generar una proteasa truncada con actividad proteolítica altamente disminuida. Así, para eliminar enormemente la autoproteólisis y posterior generación de este producto truncado, se sintetizaron variantes de TEV en las que la serina 219 se cambió o bien a asparagina (S219N) o valina (S219V). Además, está bien documentado que aunque la proteasa TEV de tipo silvestre recombinante se expresa a niveles muy altos en *E. coli*, es casi enteramente insoluble (Kapust y col., 2001). Así, para mejorar la solubilidad de la TEV expresada, se fabricaron varias variantes de aminoácidos y se ensayaron para determinar si los cambios dan como resultado solubilidad aumentada de la proteína. Las variantes de TEV sintetizadas se muestran en la Tabla 3. La variante 1 representó una construcción TEV optimizada por codones fabricada con un marcador de His C terminal y la mutación S219N. La variante 11 fue una construcción con secuencia de ADN nativo de la proteasa TEV fabricada con un marcador N terminal y la mutación S219N.

Tabla 3. Variantes de la proteasa TEV

Variante	Cambio para eliminación de autoproteólisis	Cambio que mejora la solubilidad	Marcador de afinidad	ADN SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:
1	S219N	—	Extremo C	65	66
2	S219N	L56V, S135G	Extremo N	67	68
3	S219N	T17S, N68D, 177V	Extremo N	69	70
4	S219N	N44V, L56V, S135G	Extremo N	71	72
5	S219N	L56V, N68D, S135G	Extremo N	73	74
6	S219N	T17S, L56V, N68D, 177V	Extremo N	75	76
7	S219N	T17S, N68D, 177V, S135G	Extremo N	77	78
8	S219N	T17S, N44V, L56V, N68D, 177V, S135G	Extremo C	79	80
9	S219V	T17S, N44V, L56V, N68D, 177V, S135G	Extremo N	81	82
10	S219N	T17S, N44V, L56V, N68D, 177V, S135G	Extremo N	83	84
11	S219N	—	Extremo N	85	86

Para construir las construcciones de expresión variantes pET29/TEV, se digirió una construcción pUCBHB1/TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierto que codifica la TEV; y 2) permiten a esta inserción estar unida de forma operable a un vector pET29 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Usando un procedimiento de ADN ligasa T4 esta inserción se ligó direccionalmente en un vector pET29 digerido con las mismas endonucleasas de restricción en el sitio de clonado múltiple. La mezcla de ligado se transformó en células *Acella BL21(DE3)* de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se sembraron en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contenían 50 µg/ml de kanamicina, y se colocaron en una incubadora a 37 °C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la kanamicina. Las

construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación de ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción génica TEV. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión pET29 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica variantes TEV unidas de forma operable a péptido de purificación de afinidad de polihistidina o bien carboxilo terminal o amino terminal.

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

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

Para inducir la expresión con IPTG, las células que albergan la construcción de expresión TEV se hicieron crecer primero toda la noche para producir un cultivo iniciador. Medio LB fresco se inoculó a 1:1000 con el cultivo toda la noche y se dejó crecer, con agitación, a 37 °C hasta que OD₆₀₀ alcanzó 0,7, en cuyo momento se añadió IPTG a una concentración final de 0,6 mM. Las células se cosecharon 4 horas después de la inducción y los lisados celulares totales se evaluaron para detectar la expresión diana.

Para expresar construcciones en condiciones de autoinducción, 3,0 ml de medio PA-0,5G que contenía 50 µg/ml de kanamicina se inoculó con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan la construcción de expresión apropiada y se hicieron crecer a 37 °C con agitación toda la noche. 1,0 µl de este cultivo iniciador se usó para inocular 1,0 ml de medio de autoinducción ZYP-5052 que contenía 50 µg/ml de kanamicina. Las células se hicieron crecer a 37 °C con agitación y se retiraron partes alícuotas a 5, 8, 12, 20 y 28 horas.

Para determinar la expresión de proteasa TEV total, 40 µl del cultivo celular inducido procedente de cada punto temporal se mezcló con un volumen igual de Tampón de Muestra Laemmi 2x y se incubó a 95 °C durante 10 minutos. Se añadieron 2 µl de 1 unidad/µl de benzonasa en MgSO₄ 1 M a esta mezcla y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos. Una parte alícuota de 15 µl se cargó y se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de Bis-Tris poliacrilamida prefabricada al 4-12 % de NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras, desnaturizantes. El gel se lavó y se fijó en Disolución de Fijación que comprende 10 % de metanol, 7 % de ácido acético durante 30 minutos. Después de fijar, la Disolución de Fijación se eliminó y el gel se incubó con Tinción de Gel de Proteína SYPRO Ruby a temperatura ambiente durante 3 horas. El gel se destintó entonces en solución destintadora que comprende 10 % de metanol, 7 % de ácido acético a temperatura ambiente durante 3 horas. La imagen se visualizó con un Reproductor de Imágenes en Modo Variable Typhoon 9410 y software de Análisis de Reproductor de Imágenes (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

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

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

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

C. Expresión y purificación a gran escala

- 5 Para comparar rigurosamente los niveles de expresión de proteasa TEV a partir de las cinco primeras variantes de pET29/TEV, junto con la variante 11 como control, en condiciones a gran escala, se inocularon 3,0 ml de medio PA-0,5G con 50 µg/ml de kanamicina con una única colonia de células BL21(DE3) que alberga la construcción de expresión adecuada y se hizo crecer a 37 °C con agitación toda la noche. 250 µl de este cultivo iniciador se usaron para inocular 250 ml de ZYP-5052 con 50 µg/ml de kanamicina y se hizo crecer a 37 °C con agitación durante 8 horas. Las células se sedimentaron mediante centrifugación.
- 10 Para lisar células, el sedimento celular se suspendió de nuevo en 5,0 ml/gramo de sedimento celular de solución de lisis que comprende reactivo de extracción de proteína BUGBUSTER™ (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI), 1 x conjunto III de cóctel inhibidor de proteasa (EMD Biosciences-Calbiochem, Gibbstown, NJ), 25 unidades/ml de nucleasa benzonasa y 1 Unidad/ml de rLisozima (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). La suspensión de células se incubó a temperatura ambiente en un balancín de soporte durante 20 minutos, seguido de incubación en hielo durante 15 minutos. La suspensión se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 30.350 rcf para sedimentar los desechos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Para preparar el sedimento de extracto celular insoluble para análisis SDS-PAGE, el sedimento se volvió a suspender al volumen original con 1x reactivo de extracción de proteína BUGBUSTER™.
- 15 Para purificar una variante de proteasa TEV por purificación IMAC, el lisado clarificado se mezcló con Resina de Cobalto de Afinidad con Metal Superfluido TALON™ equilibrado con Disolución de Lavado IMAC que comprende fosfato sódico 25 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM, 10 % de glicerol e imidazol 35 mM. La mezcla lisado-resina se incubó en un balancín de soporte a 4 °C durante 1 hora y después se transfirió a un soporte de columna desechable de 20 ml unido a un colector de vacío. La columna se lavó dos veces con cinco volúmenes de columna de Disolución de Lavado IMAC. La proteasa TEV se eluyó desde la resina con dos volúmenes de columna de Disolución de Lavado IMAC, que comprende fosfato sódico 25 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM, 10 % de glicerol e imidazol 500 mM, y se recogió en fracciones de 1,0 ml. Cada fracción que contiene proteína se identificó mezclando 10 µl de parte alícuota con 200 µl de reactivo de Tinte Bradford QUICKSTART™. Las fracciones de elución máximas se reunieron y se dializaron para purificación por cromatografía de intercambio iónico secundario.
- 20 Para dializar una variante de proteasa TEV purificada con IMAC, la muestra reunida que comprende la fracción de elución máxima se dializó en un FASTDIALYZER® ajustado con membrana MWCO 25 kD a 4 °C en 1 l de un Tampón de Desalado con agitación constante toda la noche. Para la cromatografía de intercambio catiónico, el tampón desalador (tampón A) comprendía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.
- 25 Para purificar la variante de proteasa TEV por cromatografía de intercambio catiónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio catiónico UNO-S1 de 1 ml, se preequilibró con Tampón A, a un caudal de 0,5 ml/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende fosfato sódico 25 mM, pH 7,0, NaCl 1 M a un caudal de 1,0 ml/min como sigue: 5 % de Tampón B para 3 ml, 20 % de Tampón B para 10 ml, 20 % a 100 % de Tampón B por encima de 10 ml. La elución de proteínas desde la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones máximas se reunieron y se determinó la concentración de proteína. Las partes alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La variante 7 de TEV tenía el rendimiento más alto de proteasa soluble (cerca de 35 mg/l) seguido por la variante 3 (cerca de 24 mg/l) y la variante 10 (cerca de 23 mg/l). Las dos variantes restantes, 5 y 6, tenían rendimientos de 18 y 8 mg/l, respectivamente. El rendimiento de la variante 11 de TEV fue cerca de 0,6 mg/l. Como tal, todas las cinco variantes de TEV primeras que contienen un cambio de aminoácidos que mejora la solubilidad dieron como resultado al menos un aumento de 10 veces en proteasa TEV soluble purificada respecto a la variante 11 de TEV que solo comprendía el cambio de aminoácidos que elimina la autoproteólisis (S219N). Cuando se comparó el orden de rango de rendimiento de proteasa TEV a partir de estudios de expresión de pequeña y gran escala, la variante 5 mostró el mayor rendimiento en expresiones a pequeña escala (Ejemplo 1C). Sin embargo, fue la variante 7 la que tuvo el rendimiento mayor en expresiones a gran escala. La repetición de la comparación de rendimientos de cargas a gran escala reveló de forma consistente que la variante 7 es la variante de mayor expresión. Como resultado, la variante 7 representó la construcción de proteasa TEV principal y se usó para todos los estudios posteriores descritos en esta memoria.
- 30 Para determinar la actividad proteolítica de las variantes de proteasa TEV, una variante de proteasa TEV, o proteasa AcTEV como control positivo, se añadió a 30 µl de una disolución de reacción que comprendía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 1 mM y 2,5 µg de un sustrato TEV y se incubó a 30 °C durante 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos. Las reacciones se inactivaron añadiendo 2 x Tampón de Muestra Laemmi e incubando la muestra a 95 °C durante 10 minutos. Una parte alícuota de 15 µl se cargó y se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de Bis-Tris poliacrilamida prefabricada al 4-12 % de NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras, desnaturizantes. El gel se lavó y se fijó en Disolución de Fijación que comprende 10 % de metanol, 7 % de ácido acético durante 30 minutos. Después de la fijación, la Disolución de Fijación se eliminó y el gel se incubó con Tinción de Gel de Proteína SYPRO Ruby a temperatura ambiente durante 3 horas. El gel se destintó entonces en Disolución Destintadora que comprende 10 % de metanol, 7 % de ácido acético a temperatura ambiente durante 3 horas. La imagen se visualizó con un Reproductor de Imágenes en Modo Variable Typhoon 9410
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

y se analizó con software de Análisis de Imágenes ImageQuantTL (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La relación de intensidades de sustrato no escindido y producto escindido se usó para calcular el porcentaje de sustrato TEV escindido. Los resultados del ensayo de actividad de proteasa TEV se dan en la Tabla 4.

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

5 Ejemplo 2

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

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

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

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

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

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

Para generar una construcción de expresión variante de pET22/TEV, se digirió una construcción de expresión de variante 7 de pET29/TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierto (SEQ ID NO: 77) que codifica la proteasa TEV (SEQ ID NO: 78); y 2) permite a esta inserción unirse de forma operable a un vector pET22 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Esta inserción se subclonó usando un procedimiento de ADN ligasa T4 en un vector pET22 digerido con las endonucleasas de restricción análogas para dar la construcción de expresión pET22/TEV apropiada. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se sembraron en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contenían 50 µg/ml de ampicilina, y se colocaron en una incubadora a 37 °C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasa de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión pET22 que comprende la molécula de

polinucleótido que codifica la variante 7 de TEV unida de forma operable a un péptido de purificación de afinidad de polihistidina amino terminal.

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

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

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

20 Para producir formas bicatenarias de BoNT/A-TEV en condiciones de autoinducción, 3,0 ml de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de ampicilina se inocularon con una única colonia de células BL21(DE3) que albergan construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pET22/TEV y se hicieron crecer a 37 °C con agitación toda la noche. Aproximadamente 1,0 µl de este cultivo iniciador se usó para inocular 1,0 ml de ZYP-5052 que contiene 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de ampicilina y se hizo crecer a 37 °C con agitación durante 3,5 horas y después a 22 °C con agitación durante 18,5 horas. Como control, células BL21(DE3) que albergan pET29/BoNT/A-TEV solo se hicieron crecer e se indujeron como se ha descrito anteriormente, excepto que solo se usaron 50 µg/ml de kanamicina como un agente selectivo.

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

30 Los resultados indican que cuando pET29/BoNT/A-TEV se expresa solo, una banda de aproximadamente 150 kDa correspondiente a la cadena sencilla de BoNT/A-TEV se detectó en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Por el contrario, cuando BoNT/A-TEV se coexpresó con proteasa TEV, se observaron dos bandas en condiciones reductoras, una de aproximadamente 50 kDa y la otra de aproximadamente 100 kDa. Además, cuando las mismas muestras se sometieron al proceso en condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 150 kDa se observó. En conjunto, estas observaciones indican que las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa vistas en condiciones reductoras corresponden a las cadenas ligera y pesada del BoNT/A-TEV, y que la presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de doble cadena de BoNT/A-TEV. Así, la coexpresión de BoNT/A-TEV y proteasa TEV en estas células da como resultado la escisión de BoNT/A-TEV en el sitio de escisión de la proteasa TEV situado en el bucle bicatenario y la posterior formación de la forma bicatenaria de BoNT/A-TEV.

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

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

45 Para purificar BoNT/A-TEV por cromatografía de intercambio aniónico, la disolución de proteína desalada se cargó en una columna de intercambio aniónico UNO-Q1 de 1 ml, se preequilibró con Tampón A, a un caudal de 0,5 ml/min. La proteína unida se eluyó por gradiente de NaCl con Tampón B que comprende Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M a un caudal de 0,5 ml/min como sigue: 3 % de Tampón B para 3 ml, 7 % de Tampón B para 10 ml, 7 % a 100 % de Tampón B por encima de 10 ml. La elución de proteínas de la columna se detectó con un detector UV-Visible a 214 nm, 260 nm y 280 nm, y todas las fracciones máximas se reunieron y la concentración de proteína se determinó. Las partes alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La proteína BoNT/A-TEV purificada se analizó mediante SDS-PAGE y los geles se tiñeron esencialmente como se describe en el

Ejemplo 1B. Los resultados confirman los experimentos a pequeña escala iniciales e indican que el BoNT/A-TEV de cadena sencilla se convierte a su forma bicatenaria con cerca del 100 % de eficacia.

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

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

Para obtener un lisado de células tratadas con BoNT/A-TEV para análisis, aproximadamente 50.000 células de un cultivo madre de la línea celular SiMa se sembraron en una placa de 96 pocillos de poli-D-lisina que contiene un medio exento de suero que contiene Medio Esencial Mínimo, GlutaMAX™ 1 2 mM con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, HEPES 10 mM y 25 µg/ml de GTb1. Estas células se incubaron en una incubadora a 37 °C en dióxido de carbono al 5 % hasta que las células se diferenciaron, evaluado mediante criterios morfológicos estándar y rutinarios, tal como detención de crecimiento y extensión de neurita (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pocillo y se sustituyó con medio fresco que contenía o bien 0 (muestra no tratada), 0,01 nM, 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,11 nM, 3,33 nM y 10,0 nM de un BoNT/A-TEV. Después de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron, se incubaron durante unos dos días adicionales sin toxina. Para cosechar las células, el medio se aspiró, se lavó con 1 x PBS, y se lisó añadiendo 30 µl de Tampón de Lisis que comprende HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, 1 % de Triton X-100 a cada pocillo, y la placa se incubó en un agitador que rota a 500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4 °C hasta sedimentar los desechos celulares y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos recubierto con anticuerpo de captura para realizar la etapa de detección.

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

Para detectar la presencia de un producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA intercalado con ECL, el Tampón de Bloqueo de las placas almacenadas se aspiró, 25 µl de un lisado de células tratadas con BoNT/A se añadió a cada pocillo y las placas se incubaron a 4 °C durante 2 h. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µl de 1 x PBS, 0,1 % de TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) sorbitán). Después de lavar, 25 µl de disolución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 de 5 µg/ml que comprende el 2 % de Reactivo de Bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0,1 % de TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) sorbitano) se añadieron a cada pocillo, la placa se selló, y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después de la incubación del anticuerpo de detección α-SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0,1 % de TWEEN-20® (monolaureato de polioxietileno (20) sorbitano). Los datos en bruto obtenidos a partir del reproductor de imágenes ECL se transfirieron entonces a SigmaPlot v. 9.0 y se usó un ajuste logístico de 4 parámetros para definir las curvas de dosis-respuesta. No hubo limitaciones usadas para la función logística de 4 parámetros cuando se trazaron los datos. Se generaron presentaciones gráficas usando el siguiente análisis: R2 (coeficiente de correlación), a (Max para conjunto de datos), b (pendiente), y X0 ± EE (valor EC₅₀ ± error estándar). Los resultados de dos procesos independientes indican que la actividad de ambas dobles cadenas fue casi idéntica y de 2 veces de la doble cadena nativa.

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

Cada ratón se inyectó con 5 µl de una de siete dosis diferentes de BoNT/A-TEV (0,01 nM, 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,11 nM, 3,33 nM y 10,0 nM) con una aguja de calibre 30 en el músculo gastrocnemio de la pata trasera derecha. Como control, el músculo gastrocnemio de la pata trasera izquierda se inyectó con 5 µl de una disolución que no contenía nada de BoNT/A-TEV. Se observaron a los ratones para la respuesta DAS de forma consecutiva durante los primeros 4 días. El DAS se leyó elevando a cada ratón por la cola y observando de forma precisa las

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

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

en la que y es la respuesta, a es la y_{max} asintótica, b es la pendiente, x es la dosis, y x₀ es la dosis DE₅₀. Para determinaciones de DE₅₀ máxima, Y_{max} se puso a 4 (lectura DAS máxima en escala). Los valores de DE₅₀ media (máximo y/o AUC) se informatizaron para cada estudio de ocho dosis realizado.

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

Ejemplo 3

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

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

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

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

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

Para fabricar una célula que comprende las construcciones de expresión pET29/BoNT/A-TEV y pBAD/TEV, una construcción de expresión pET29/BoNT/A-TEV (descrita en el Ejemplo 2A) se transformó en células BL21(DE3) *E. coli* electro-competentes que albergan la construcción de expresión de variante 7 de pBAD/TEV usando electroporación, se sembraron en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contienen 50 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina, y se colocaron en una incubadora a 37 °C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen ambas construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la

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

5

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

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

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

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

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

Ejemplo 4

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

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

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

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

secuenciación usando BIG DYE TERMINATOR™ Química 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

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

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

30 Para producir formas bicatenarias de BoNT/A-TEV en condiciones de autoinducción, 3,0 ml de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/ml de kanamicina se inocularon con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pET29/BoNT/A-TEV y se hizo crecer a 37 °C con agitación toda la noche. Aproximadamente 250 µl de este cultivo iniciador se usaron para inocular 250 ml de ZYP-5052 que contiene 50 µg/ml de kanamicina y se hizo crecer a 37 °C con agitación durante 3,5 horas y después a 22 °C con agitación durante 18,5 horas. Las células se sedimentaron mediante centrifugación. Las células se lisaron, se purificaron por IMAC, se desalaron, se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico, se analizaron por SDS-PAGE, y los geles se tiñeron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D. Como control, las células BL21(DE3) que albergan pET29/BoNT/A-TEV solo se hicieron crecer y se indujeron como se ha descrito anteriormente, excepto que se usaron solo 50 µg/ml de kanamicina como un agente selectivo.

40 Los resultados indican que cuando se expresó solo, una banda de aproximadamente 150 kDa correspondiente a la cadena sencilla de BoNT/A-TEV se detectó en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Por el contrario, cuando BoNT/A-TEV se coexpresó con proteasa TEV, se observaron dos bandas en condiciones reductoras, una de aproximadamente 50 kDa y la otra de aproximadamente 100 kDa. Además, cuando las mismas muestras se sometieron al proceso en condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa desaparecieron y se observó una nueva banda de aproximadamente 150 kDa. En conjunto, estas observaciones indican que las bandas de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 100 kDa vistas en condiciones reductoras corresponden a las cadenas ligera y pesada del BoNT/A-TEV, y que la presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de doble cadena de BoNT/A-TEV. Los resultados también indicaron que el BoNT/A-TEV de cadena sencilla se convirtió a su forma bicatenaria con más del 95 % de eficacia. Así, la coexpresión de BoNT/A-TEV y proteasa TEV a partir de una construcción de expresión dual en estas células da como resultado la escisión de BoNT/A-TEV en el sitio de escisión de la proteasa TEV situado en el bucle bicatenario y la posterior formación de la forma bicatenaria de BoNT/A-TEV.

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

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

65 Para construir la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xBoNT/A-TEV, se realizaron dos reacciones de clonación secuencial. Primero, el marco de lectura abierto (SEQ ID NO: 91) que codifica la variante 7 de TEV (SEQ ID NO: 22) se amplificó por PCR a partir de la construcción de expresión de variante 7 de pET29/TEV. El

extremo 5' del marco de lectura abierto que codifica el marcador de afinidad con poli-histidina se excluyó de la amplificación para codificar una proteasa sin marcador. Después de la amplificación, el producto de PCR se digirió en los sitios de restricción única, se incorporó a los extremos del producto de PCR por medio de los cebadores de PCR, y se clonó en los sitios correspondientes en MCS1 (sitio de clonación múltiple) del plásmido de expresión dual pRSFduet-1 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI) usando un procedimiento de ADN ligasa T4. Esta construcción intermedia se designó pRSduet/TEV. Después, una construcción de expresión de pET29/BoNT-A/TEV se digirió con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierto (SEQ ID NO: 87) que codifica el BoNT/A-TEV (SEQ ID NO: 88); y 2) permiten que esta inserción esté unida de forma operable al MCS2 en pRSFduet/TEV. La inserción BoNT/A-TEV se subclonó en el MCS2 del vector pRSFduet usando un procedimiento de ADN ligasa T4 para dar la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xBoNT/A-TEV apropiada. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pRSFduet en la que la transcripción a partir del primer promotor T7 produciría ARNm que codifican TEV y BoNT/A-TEV y la transcripción del segundo promotor T7 produciría ARNm que codificaría solo BoNT/A-TEV.

Esta estrategia de clonado dará una construcción de expresión dual de pRSFduet en la que el primer promotor T7 transcribirá el marco de lectura abierto que codifica BoNT/A-TEV y el segundo promotor T7 transcribirá el marco de lectura abierto que codifica proteasa TEV.

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

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

E. Activación in situ de BoNT/A-TEV.

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

Ejemplo 5

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

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

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

Para construir una construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xNociLHN/A-TEV, se digirió una construcción de expresión pET29/NociLHN/A-TEV con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende el marco de lectura abierto (SEQ ID NO: 94) que codifica el NociLHN/A-TEV (SEQ ID NO: 95); y 2) permiten a esta inserción unirse de forma operable al MCS2 de pRSFduet/TEV, un vector pRSFduet-1 que alberga la variante 7 de

TEV en MCS1 (Descrito en el Ejemplo 3C). La inserción NociLHN/A-TEV se subclonó en el MCS2 de la construcción pRSFduet/TEV usando un procedimiento de ADN ligasa T4 para dar la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xNociLHN/A-TEV apropiada. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se sembraron en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contenían 50 µg/ml de kanamicina, y se colocaron en una incubadora a 37 °C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen las construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a la kanamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pRSFduet en la que la transcripción a partir del primer promotor T7 produciría ARNm que codifican TEV y NociLHN/A-TEV y la transcripción a partir del segundo promotor T7 produciría ARNm que codifican solo NociLHN/A-TEV.

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

Para producir formas bicatenarias de NociLHN/A-TEV en condiciones de autoinducción, 3,0 ml de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/ml de kanamicina se inocularon con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xNociLHN/A-TEV y se hizo crecer a 37 °C con agitación toda la noche. 250 µl de este cultivo iniciador se usaron para inocular 250 ml de ZYP-5052 que contiene 50 µg/ml de kanamicina y se hizo crecer a 37 °C con agitación durante 8 horas y después a 16 °C con agitación durante 18 horas. Las células se sedimentaron mediante centrifugación. Las células se lisaron, se purificaron con IMAC, se desalaron, se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico, se analizaron por SDS-PAGE, y los geles se tiñeron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D. Como control, células BL21(DE3) que albergan NociLHN/A-TEV solo se hicieron crecer y se indujeron como se ha descrito anteriormente.

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

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

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

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

Para producir formas bicatenarias de NociLHN/A-TEV en condiciones de autoinducción, 3,0 ml de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/ml de kanamicina se inocularon con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xDynLHN/A-TEV y se hizo crecer a 37 °C con agitación toda la noche. 250 µl de este cultivo iniciador se usaron para inocular 250 ml de ZYP-5052 que contiene 50 µg/ml de kanamicina y se hizo crecer a 37 °C con agitación durante 8 horas y después a 16 °C con agitación durante 18

horas. Las células se sedimentaron mediante centrifugación. Las células se lisaron, se purificaron con IMAC, se desalaron, se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico, se analizaron por SDS-PAGE, y los geles se tiñeron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2D. Como control, células BL21(DE3) que albergan DynLHN/A-TEV solo se hicieron crecer y se indujeron como se ha descrito anteriormente.

Los resultados indican que cuando se expresa solo, una banda de aproximadamente 102 kDa correspondiente a la cadena sencilla de DynLHN/A-TEV se detectó en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Por el contrario, cuando DynLHN/A-TEV se coexpresó con proteasa TEV, dos bandas se observaron en condiciones reductoras, una de aproximadamente 50,8 kDa y la otra de aproximadamente 52 kDa. Además, cuando las mismas muestras se sometieron al proceso en condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 50,8 kDa y aproximadamente 52 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 102 kDa se observó. En conjunto, estas observaciones indican que la banda de aproximadamente 50,8 kDa corresponde al dominio enzimático de toxina clostridial y una banda de aproximadamente 52 kDa corresponde al dominio de translocación de toxina clostridial con el resto de señalización de dinorfina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativo de formación de doble cadena de DynLHN/A-TEV y también que la cadena sencilla de DynLHN/A-TEV se convirtió a su forma bicatenaria con más del 95 % de eficacia. Así, la coexpresión de DynLHN/A-TEV y proteasa TEV a partir de una construcción de expresión dual en estas células da como resultado la escisión de DynLHN/A-TEV en el sitio de escisión de la proteasa TEV situado en el dominio de unión opioide al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma bicatenaria de DynLHN/A-TEV.

Ejemplo 6

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

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

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

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

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

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

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

5 Para fabricar una célula que comprende construcciones de expresión pET29/GalLHN/A-TEV y pColdIV/TEV, la construcción de expresión pET29/GalLHN/A-TEV se transformó en células BL21(DE3) *E. coli* electro-competentes que albergan pColdIV/TEV usando electroporación, se sembraron en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contienen 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina, y se colocaron en una incubadora a 37 °C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen ambas construcciones de expresión se identificaron como colonias resistentes a ampicilina-kanamicina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmidos de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión de endonucleasa de restricción para determinar la presencia de ambas construcciones. Esta estrategia de clonado dio células que comprenden construcciones de expresión pET29/GalLHN/A-TEV y pColdIV/TEV.

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

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

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

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

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

Los resultados indican que cuando GalLHN/A-TEV se coexpresó con proteasa TEV, dos bandas casi superpuestas se observaron en condiciones reductoras, una de aproximadamente 51,1 kDa y la otra de aproximadamente 52,1 kDa. Además, cuando las mismas muestras se sometieron al proceso en condiciones no reductoras, las bandas de aproximadamente 51,1 kDa y 52,1 kDa desaparecieron y una nueva banda de aproximadamente 103 kDa se observó. En conjunto, estas observaciones indican que la banda de aproximadamente 51,1 kDa corresponde al

dominio enzimático de toxina clostridial y la banda de aproximadamente 52,1 kDa corresponde al dominio de translocación de toxina clostridial con el resto de señalización de galanina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativo de formación de doble cadena de GalLHN/A-TEV y también que la cadena sencilla de GalLHN/A-TEV se convirtió a su forma bicatenaria con aproximadamente el 90 % de eficacia. Así, la coexpresión de GalLHN/A-TEV y proteasa TEV en estas células a partir de plásmidos independientes da como resultado la escisión de GalLHN/A-TEV en el sitio de escisión de la proteasa TEV situado en el dominio de unión de galanina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma bicatenaria de GalLHN/A-TEV.

10 Ejemplo 7: Profético

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

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

20 **A. Construcción de la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xGalLHN/A-TEV.**

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

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

Para producir formas bicatenarias de GalLHN/A-TEV en condiciones de autoinducción, 3,0 ml de medio PA-0,5G que contiene 50 µg/ml de kanamicina se inocularán con una única colonia de células BL21(DE3) que comprende la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xGalLHN/A-TEV y se hará crecer a 37 °C con agitación toda la noche. Se usarán 250 µl de este cultivo iniciador para inocular 250 ml de ZYP-5052 que contiene 50 µg/ml de kanamicina y se hará crecer a 37 °C con agitación durante 8 horas y después a 16 °C con agitación durante 18 horas. Las células se sedimentarán mediante centrifugación, se lisarán, se purificarán con IMAC, se desalarán y se purificarán por cromatografía de intercambio aniónico como se describe en el Ejemplo 5D. La proteína diana purificada se analizará por SDS-PAGE en condiciones tanto reductoras como no reductoras, y los geles se teñirán esencialmente como se describe en el Ejemplo 1B para evaluar los niveles de expresión y la extensión a la que GalLHN/A-TEV producido a partir de la construcción de expresión dual pRSFduet/TEV/2xGalLHN/A-TEV se convierte a su forma bicatenaria.

Ejemplo 8

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

El siguiente ejemplo ilustra procedimientos útiles para purificar y cuantificar cualquiera de las proteínas que comprenden un bucle bicatenario que comprende un dominio de unión de opioides al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado divulgado en la presente memoria descriptiva, en el que la proteína diana y la proteasa se coexpresan en una construcción de expresión dual y bajo el control de dos promotores independientes en el sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS).

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

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

Para generar la construcción de expresión dual pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV, pUCBHB1/p10-TEV/polH-DynLHN/A-TEV se digirió con endonucleasas de restricción que 1) escinden la inserción que comprende la región de codificación entera de la variante 7 de TEV bajo el control del promotor p10 y DynLHN/A-TEV en la dirección contraria bajo el control del promotor polH; y 2) permiten que esta inserción esté unida de forma operable a un vector de transferencia pBAC-6 (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Esta inserción se subclonó usando un procedimiento de ADN ligasa T4 en el vector de transferencia pBAC-6 digerido con las endonucleasas de restricción análogas para dar la construcción de expresión dual pBAC-6 fabricada que comprende marco de lectura abierto de la variante 7 de proteasa TEV corriente abajo del promotor p10 y un segundo marco de lectura abierto de DynLHN/A-TEV corriente abajo del promotor polH. La mezcla de ligado se transformó en células Acella BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) por electroporación, se sembraron en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contenían 100 µg/ml de ampicilina, y se colocaron en una incubadora a 37 °C para el crecimiento toda la noche. Las bacterias que contienen construcción de expresión se identificaron como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislaron usando un procedimiento de mini-preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizaron por mapeo por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando ambas hebras de ADN para confirmar la presencia e integridad de la inserción. Esta estrategia de clonado dio una construcción de expresión dual pBAC-6 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica un DynLH/A-TEV unido de forma operable a un marcador de purificación de afinidad de polihistidina de carboxilo terminal y una proteasa TEV.

B. Generación de solución madre de baculovirus recombinante TEV/DynLHN/A-TEV de valoración alta.

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

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

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

Para purificar DynLHN/A-TEV bicatenaria mediante purificación Magne-His, el sedimento celular se resuspendió en 20 ml de PBS sin Ca^{2+} o Mg^{2+} en presencia de 100 µl de Reactivo de PopCultivo de Insecto y 20 µl (10U) de nucleasa benzonasa, se mezcló suavemente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de aclarar el lisado celular mediante centrifugación a 16.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se mezcló con 4 ml de Resina de Purificación de Proteína Magne-His™ suspendida uniformemente (Promega Corp., Madison, WI). La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con basculamiento suave para unir la proteína diana. El tubo se transfirió a una unidad de separación magnética MagneSil durante aproximadamente 2 minutos para permitir la captura de las partículas de resina. Después de eliminar el sobrenadante, el tubo se separó de la unidad de separación y la resina se suspendió de nuevo en 10 ml de tampón de lavado IMAC. De nuevo, la resina se capturó en la unidad de separación magnética y el tampón de lavado se eliminó. La etapa de lavado se repitió dos

veces más. Para eluir la proteína diana, la resina se suspendió de nuevo en 2,5 ml del tampón de elución Magne-His™ (HEPES 100 mM, pH 7,5, imidazol 500 mM), se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, la resina se capturó en la unidad de separación magnética y la solución sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La etapa de elución se repitió de nuevo para maximizar la recuperación de la diana a partir de la resina magnética.

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

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

20 Los resultados indican que cuando DynLHN/A-TEV se coexpresó con la proteasa TEV en células de insecto y se purificó a casi homogeneidad, se observaron dos bandas casi superpuestas en condiciones reductoras, una de aproximadamente 51 kDa y otra de aproximadamente 52 kDa. Además, cuando las mismas muestras se sometieron al proceso en condiciones no reductoras, las dos bandas de aproximadamente 50 kDa y 52 kDa desaparecieron y se observó una nueva banda de aproximadamente 102 kDa. En conjunto, estas observaciones indican que la banda de aproximadamente 51 kDa corresponde al dominio enzimático de la toxina clostridial y la banda de aproximadamente 52 kDa corresponde al dominio de translocación de la toxina clostridial con el resto de señalización de dinorfina unido a su extremo amino. La presencia de estas dos bandas era indicativa de formación de doble cadena de DynLHN/A-TEV y también de que la DynLHN/A-TEV de cadena sencilla se convirtió a su forma bicatenaria con 80-90 % de eficacia. Así, la coexpresión de DynLHN/A-TEV y proteasa TEV en células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante TEV/DynLHN/A-TEV generado a partir de la construcción de expresión dual pBAC-6/TEV/DynLHN/A-TEV da como resultado la escisión de DynLHN/A-TEV en el sitio de escisión de la proteasa TEV situado en el dominio de unión de dinorfina al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado y la posterior formación de la forma bicatenaria de DynLHN/A-TEV.

35 Aunque aspectos de la presente invención se han descrito con referencia a las realizaciones divulgadas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos específicos divulgados son solo ilustrativos de estos aspectos y de ninguna forma limitan la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ghanshani, Sanjiv Le, Linh Q. Liu, Li Steward, Lance E.
- 5 <120> Procedimientos de conversión intracelular de proteínas
de cadena sencilla en su forma bicatenaria
- <130> 18469 (BOT)
- 10 <150> US 61/286.963
- <151> 25-01-2010
- 15 <160> 107
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 1296
- <212> PRT
- 25 <213> Clostridium botulinum Serotipo A
- <400> 1

ES 2 592 856 T3

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

ES 2 592 856 T3

290						295					300					
Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	
305					310					315						320
Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	
				325					330					335		
Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp	
			340				345						350			
Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	
			355			360						365				
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr	
	370					375				380						
Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn	
385					390					395					400	
Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu	
				405					410					415		
Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Arg	
			420					425					430			
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Gly	Tyr	Asn	Lys	
		435				440						445				
Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe	
	450					455				460						
Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu	
465					470					475					480	
Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu	
				485					490					495		
Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro	
			500					505					510			
Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu	
		515				520						525				
Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu	
	530					535				540						
Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu	
545					550					555					560	
His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	
				565					570					575		
Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	
			580					585					590			
Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	
		595				600						605				
Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr	
	610					615						620				
Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	
625					630					635					640	
Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	
				645					650					655		
Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	
			660					665					670			
Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys	
	675					680						685				
Val	Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	
	690					695						700				
Lys	Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys	
705					710					715					720	
Val	Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	
				725					730					735		
Glu	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	
			740					745					750			
Gln	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp	
		755				760						765				
Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	
	770					775						780				
Asn	Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	
785					790					795					800	

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
805 810 815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
820 825 830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
835 840 845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
850 855 860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn
865 870 875 880
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser
885 890 895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn
900 905 910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu
915 920 925
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser
930 935 940
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn
945 950 955 960
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
965 970 975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu
980 985 990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser
995 1000 1005
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu
1010 1015 1020
Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
1025 1030 1035 1040
Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys
1045 1050 1055
Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe
1060 1065 1070
Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr
1075 1080 1085
Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr
1090 1095 1100
Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn
1105 1110 1115 1120
Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
1125 1130 1135
Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
1140 1145 1150
Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
1155 1160 1165
Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
1170 1175 1180
Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala
1185 1190 1195 1200
Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
1205 1210 1215
Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr
1220 1225 1230
Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
1235 1240 1245
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
1250 1255 1260
Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys
1265 1270 1275 1280
Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu
1285 1290 1295

<211> 1291

<212> PRT

5 <213> Clostridium botulinum Serotipo B

<400> 2

```

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn
 1          5          10          15
Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg
 20          25          30
Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu
 35          40          45
Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly
 50          55          60
Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn
 65          70          75          80
Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85          90          95
Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile
100          105          110
Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu
115          120          125
Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn
130          135          140
Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
145          150          155          160
Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
165          170          175
Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
180          185          190
Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
195          200          205
Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
210          215          220
Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
225          230          235          240
Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
245          250          255
Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
260          265          270
Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
275          280          285
Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
290          295          300
Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
305          310          315          320
Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
325          330          335
Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
340          345          350
Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
355          360          365
Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
370          375          380
Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
385          390          395          400
Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
405          410          415
Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
420          425          430
Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp
435          440          445

```

ES 2 592 856 T3

Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
 450 455 460
 Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
 465 470 475 480
 Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
 485 490 495
 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525
 Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 530 535 540
 Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp
 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575
 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asn Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620
 Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640
 Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro
 645 650 655
 Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670
 Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685
 Arg Asn Glu Lys Trp Ser Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700
 Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr
 705 710 715 720
 Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735
 Arg Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750
 Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile
 755 760 765
 Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met
 770 775 780
 Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
 785 790 795 800
 Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asn Lys Tyr Leu
 820 825 830
 Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile
 835 840 845
 Leu Ile Glu Met Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile
 850 855 860
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly
 865 870 875 880
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys
 885 890 895
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val
 915 920 925
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn
 930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser

ES 2 592 856 T3

```

945          950          955          960
Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile
          965          970          975
Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg
          980          985          990
Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
          995          1000          1005
Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser
          1010          1015          1020
Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile
1025          1030          1035          1040
Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met
          1045          1050          1055
Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Glu
          1060          1065          1070
Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
          1075          1080          1085
Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly
          1090          1095          1100
Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Pro Val Gly Glu
1105          1110          1115          1120
Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr
          1125          1130          1135
Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn
          1140          1145          1150
Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr
          1155          1160          1165
Leu Asp Phe Phe Asn Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Thr Tyr Lys
          1170          1175          1180
Tyr Phe Lys Lys Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp
1185          1190          1195          1200
Ser Asp Glu Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln
          1205          1210          1215
Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr
          1220          1225          1230
Asp Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile
          1235          1240          1245
Val Phe Glu Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
          1250          1255          1260
Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Leu Lys Leu Gly Cys Asn Trp
1265          1270          1275          1280
Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
          1285          1290

```

<210> 3

5 <211> 1291

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum Serotipo C1

10

<400> 3

ES 2 592 856 T3

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

ES 2 592 856 T3

Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Thr
100 105 110
Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
115 120 125
Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
130 135 140
Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
145 150 155 160
Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
165 170 175
Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile
180 185 190
Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asp
195 200 205
Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile
210 215 220
Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly
225 230 235 240
Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Thr Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile
245 250 255
Phe Tyr Ser Gln Tyr Asn Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala
260 265 270
Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr
275 280 285
Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Arg Leu
290 295 300
Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ile Gly
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser
325 330 335
Ser Gly Glu Val Thr Val Asn Arg Asn Lys Phe Val Glu Leu Tyr Asn
340 345 350
Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn
355 360 365
Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro Val Thr
370 375 380
Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Val Tyr Asp Ile Gln Asn Gly Phe Asn
385 390 395 400
Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn Leu Ser
405 410 415
Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu Tyr Leu
420 425 430
Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn
435 440 445
Lys Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val Lys Asn Thr Asp Leu Pro
450 455 460
Phe Ile Gly Asp Ile Ser Asp Val Lys Thr Asp Ile Phe Leu Arg Lys
465 470 475 480
Asp Ile Asn Glu Glu Thr Glu Val Ile Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Ser
485 490 495
Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu
500 505 510
Asp Leu Leu Tyr Pro Ser Ile Asp Ser Glu Ser Glu Ile Leu Pro Gly
515 520 525
Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu
530 535 540
Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu
545 550 555 560
Asp Phe Thr Phe Thr Arg Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Ala
565 570 575
Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Thr Leu Ala Asn Lys Val Asn Ala Gly
580 585 590
Val Gln Gly Gly Leu Phe Leu Met Trp Ala Asn Asp Val Val Glu Asp

ES 2 592 856 T3

	595					600				605					
Phe	Thr	Thr	Asn	Ile	Leu	Arg	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Lys	Ile	Ser	Asp
	610					615				620					
Val	Ser	Ala	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Ser	Asn
625					630					635					640
Ser	Val	Arg	Arg	Gly	Asn	Phe	Thr	Glu	Ala	Phe	Ala	Val	Thr	Gly	Val
				645					650					655	
Thr	Ile	Leu	Leu	Glu	Ala	Phe	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Pro	Ala	Leu	Gly
			660					665					670		
Ala	Phe	Val	Ile	Tyr	Ser	Lys	Val	Gln	Glu	Arg	Asn	Glu	Ile	Ile	Lys
	675						680					685			
Thr	Ile	Asp	Asn	Cys	Leu	Glu	Gln	Arg	Ile	Lys	Arg	Trp	Lys	Asp	Ser
	690					695					700				
Tyr	Glu	Trp	Met	Met	Gly	Thr	Trp	Leu	Ser	Arg	Ile	Ile	Thr	Gln	Phe
705					710					715					720
Asn	Asn	Ile	Ser	Tyr	Gln	Met	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ala	Gly
				725					730					735	
Ala	Ile	Lys	Ala	Lys	Ile	Asp	Leu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Ser	Gly	Ser
			740					745						750	
Asp	Lys	Glu	Asn	Ile	Lys	Ser	Gln	Val	Glu	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Leu
		755					760					765			
Asp	Val	Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Ile	Asn	Lys	Phe	Ile	Arg
	770					775					780				
Glu	Cys	Ser	Val	Thr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Lys	Val	Ile
785					790					795					800
Asp	Glu	Leu	Asn	Glu	Phe	Asp	Arg	Asn	Thr	Lys	Ala	Lys	Leu	Ile	Asn
				805					810					815	
Leu	Ile	Asp	Ser	His	Asn	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Val	Asp	Lys	Leu
		820						825						830	
Lys	Ala	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Phe	Gln	Asn	Thr	Ile	Pro	Phe	Asn	Ile
	835						840					845			
Phe	Ser	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ser	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Ile	Asn	Glu	Tyr
	850					855					860				
Phe	Asn	Asn	Ile	Asn	Asp	Ser	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	Gln	Asn	Arg	Lys
865					870						875				880
Asn	Thr	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asn	Ala	Glu	Val	Ser	Glu	Glu
				885					890					895	
Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Asn	Pro	Ile	Phe	Pro	Phe	Asp	Phe	Lys	Leu	Gly
		900						905						910	
Ser	Ser	Gly	Glu	Asp	Arg	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	Asn
		915					920							925	
Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Ser	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe	Trp	Ile
	930					935					940				
Arg	Ile	Asn	Lys	Trp	Val	Ser	Asn	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asp
945					950					955					960
Ser	Val	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Ser	Ile	Gly	Ile	Ile	Ser	Asn	Phe
			965						970					975	
Leu	Val	Phe	Thr	Leu	Lys	Gln	Asn	Glu	Asp	Ser	Glu	Gln	Ser	Ile	Asn
		980						985						990	
Phe	Ser	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Asn	Ala	Pro	Gly	Tyr	Asn	Lys	Trp	Phe
	995						1000					1005			
Phe	Val	Thr	Val	Thr	Asn	Asn	Met	Met	Gly	Asn	Met	Lys	Ile	Tyr	Ile
	1010					1015					1020				
Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Asp	Thr	Ile	Lys	Val	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile
1025					1030						1035				1040
Asn	Phe	Ser	Lys	Thr	Ile	Thr	Phe	Glu	Ile	Asn	Lys	Ile	Pro	Asp	Thr
				1045					1050					1055	
Gly	Leu	Ile	Thr	Ser	Asp	Ser	Asp	Asn	Ile	Asn	Met	Trp	Ile	Arg	Asp
			1060						1065				1070		
Phe	Tyr	Ile	Phe	Ala	Lys	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	Asp	Ile	Asn	Ile	Leu
	1075						1080					1085			
Phe	Asn	Ser	Leu	Gln	Tyr	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Asp	Tyr	Trp	Gly	Asn
	1090						1095							1100	

ES 2 592 856 T3

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

<210> 4

5 <211> 1276

<212> PRT

10 <213> Clostridium botulinum Serotipo D

<400> 4

ES 2 592 856 T3

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

				245						250				255	
Phe	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Pro	Asn	Val	Gln	Phe	Glu	Glu	Leu	Tyr	Thr
			260					265					270		
Phe	Gly	Gly	Leu	Asp	Val	Glu	Ile	Ile	Pro	Gln	Ile	Glu	Arg	Ser	Gln
	275						280				285				
Leu	Arg	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	His	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ala	Lys	Arg	Leu
	290					295					300				
Asn	Asn	Ile	Asn	Lys	Thr	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ile	Ser	Asn	Ile	Asp
305					310					315					320
Lys	Tyr	Lys	Lys	Ile	Phe	Ser	Glu	Lys	Tyr	Asn	Phe	Asp	Lys	Asp	Asn
				325					330					335	
Thr	Gly	Asn	Phe	Val	Val	Asn	Ile	Asp	Lys	Phe	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ser
			340					345					350		
Asp	Leu	Thr	Asn	Val	Met	Ser	Glu	Val	Val	Tyr	Ser	Ser	Gln	Tyr	Asn
	355						360					365			
Val	Lys	Asn	Arg	Thr	His	Tyr	Phe	Ser	Arg	His	Tyr	Leu	Pro	Val	Phe
	370					375					380				
Ala	Asn	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn	Ile	Tyr	Thr	Ile	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn
385				390						395					400
Leu	Thr	Asn	Lys	Gly	Phe	Asn	Ile	Glu	Asn	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Glu
				405					410					415	
Arg	Asn	Pro	Ala	Leu	Gln	Lys	Leu	Ser	Ser	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Leu
			420					425					430		
Phe	Thr	Lys	Val	Cys	Leu	Arg	Leu	Thr	Lys	Asn	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
	435						440					445			
Thr	Cys	Ile	Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Pro	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys
	450					455					460				
Asp	Ser	Ile	Ser	Gln	Glu	Ile	Phe	Glu	Asn	Lys	Ile	Ile	Thr	Asp	Glu
465				470					475						480
Thr	Asn	Val	Gln	Asn	Tyr	Ser	Asp	Lys	Phe	Ser	Leu	Asp	Glu	Ser	Ile
				485					490					495	
Leu	Asp	Gly	Gln	Val	Pro	Ile	Asn	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Pro	Leu	Leu
			500					505					510		
Pro	Asn	Val	Asn	Met	Glu	Pro	Leu	Asn	Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Val
	515						520					525			
Phe	Tyr	Asp	Asp	Ile	Thr	Lys	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Asn	Ser	Tyr	Tyr
	530					535					540				
Tyr	Leu	Glu	Ser	Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Asn	Val	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu
545				550						555					560
Thr	Thr	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ser	Asn	Lys	Ile	Tyr	Thr
				565					570					575	
Phe	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Asn	Lys	Gly	Val	Gln	Ala	Gly
			580					585					590		
Leu	Phe	Leu	Asn	Trp	Ala	Asn	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Phe	Thr	Thr	Asn
	595					600					605				
Ile	Met	Lys	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Lys	Ile	Ser	Asp	Val	Ser	Val	Ile
	610					615					620				
Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg
625				630						635					640
Gly	Asn	Phe	Asn	Gln	Ala	Phe	Ala	Thr	Ala	Gly	Val	Ala	Phe	Leu	Leu
				645					650					655	
Glu	Gly	Phe	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Pro	Ala	Leu	Gly	Val	Phe	Thr	Phe
			660					665					670		
Tyr	Ser	Ser	Ile	Gln	Glu	Arg	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Thr	Ile	Glu	Asn
	675					680						685			
Cys	Leu	Glu	Gln	Arg	Val	Lys	Arg	Trp	Lys	Asp	Ser	Tyr	Gln	Trp	Met
	690					695					700				
Val	Ser	Asn	Trp	Leu	Ser	Arg	Ile	Thr	Thr	Gln	Phe	Asn	His	Ile	Asn
705				710						715					720
Tyr	Gln	Met	Tyr	Asp	Ser	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala
				725					730					735	
Lys	Ile	Asp	Leu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Ser	Gly	Ser	Asp	Lys	Glu	Asn
			740					745					750		

ES 2 592 856 T3

Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile
755 760 765
Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val
770 775 780
Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn
785 790 795 800
Lys Phe Asp Leu Arg Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser
805 810 815
His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val
820 825 830
Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Met Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr
835 840 845
Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile
850 855 860
Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Ala Leu Val
865 870 875 880
Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Gly Asp Asn Val Gln
885 890 895
Leu Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser Ser Ser Gly Asp
900 905 910
Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Ile Leu Tyr Ser Ala Ile Tyr
915 920 925
Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Thr
930 935 940
Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile Glu Gln Asn Ser
945 950 955 960
Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu Trp Ile Leu Gln
965 970 975
Asp Val Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp Tyr Ser Glu Ser
980 985 990
Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
995 1000 1005
Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Leu Lys
1010 1015 1020
Gln Ser Gln Lys Ile Glu Asp Leu Asp Glu Val Lys Leu Asp Lys Thr
1025 1030 1035 1040
Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn Gln Met Leu Trp
1045 1050 1055
Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser Lys Glu Leu Ser Asn Glu Asp Ile
1060 1065 1070
Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Leu Arg Asn Val Ile Lys Asp Tyr
1075 1080 1085
Trp Gly Asn Pro Leu Lys Phe Asp Thr Glu Tyr Tyr Ile Ile Asn Asp
1090 1095 1100
Asn Tyr Ile Asp Arg Tyr Ile Ala Pro Glu Ser Asn Val Leu Val Leu
1105 1110 1115 1120
Val Gln Tyr Pro Asp Arg Ser Lys Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Ile Thr
1125 1130 1135
Ile Lys Ser Val Ser Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Gly
1140 1145 1150
Asp Asn Ile Ile Leu His Met Leu Tyr Asn Ser Arg Lys Tyr Met Ile
1155 1160 1165
Ile Arg Asp Thr Asp Thr Ile Tyr Ala Thr Gln Gly Gly Glu Cys Ser
1170 1175 1180
Gln Asn Cys Val Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn Leu Gly Asn Tyr
1185 1190 1195 1200
Gly Ile Gly Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser Lys Asn Lys Tyr
1205 1210 1215
Cys Ser Gln Ile Phe Ser Ser Phe Arg Glu Asn Thr Met Leu Leu Ala
1220 1225 1230
Asp Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Lys Asn Ala Tyr Thr Pro
1235 1240 1245
Val Ala Val Thr Asn Tyr Glu Thr Lys Leu Leu Ser Thr Ser Ser Phe

1250 1255 1260
Trp Lys Phe Ile Ser Arg Asp Pro Gly Trp Val Glu
1265 1270 1275

ES 2 592 856 T3

<210> 5

<211> 1252

5 <212> PRT

<213> Clostridium botulinum Serotipo E

10

<400> 5

```

Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg
 1      5      10      15
Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser
      20      25      30
Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile
      35      40      45
Gly Thr Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly
      50      55      60
Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys
      65      70      75      80
Asp Arg Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn
      85      90      95
Asn Leu Ser Gly Gly Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro
      100     105     110
Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp
      115     120     125
Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu
      130     135     140
Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
      145     150     155     160
Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
      165     170     175
Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
      180     185     190
Arg Phe Asn Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
      195     200     205
Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
      210     215     220
Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
      225     230     235     240
Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
      245     250     255
Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
      260     265     270
Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
      275     280     285
Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
      290     295     300
Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
      305     310     315     320
Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
      325     330     335
Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
      340     345     350
Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
      355     360     365
Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
      370     375     380
Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
      385     390     395     400
Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
      405     410     415

```

Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala
 485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His
 500 505 510
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val
 515 520 525
 Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala
 530 535 540
 Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile
 545 550 555 560
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile
 565 570 575
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr
 580 585 590
 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu
 595 600 605
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala
 610 615 620
 Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu
 625 630 635 640
 Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser
 645 650 655
 Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys
 660 665 670
 Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn
 675 680 685
 Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met
 690 695 700
 Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu
 705 710 715 720
 Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn
 725 730 735
 Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750
 Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn

ES 2 592 856 T3

	915					920						925			
Lys	Ile	Val	Asn	Val	Asn	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Arg
	930					935						940			
Asp	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Leu	Asn	His	Asn	Glu	Ile	Ile
945				950						955					960
Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Asn	Ala	Gly	Ile	Asn	Gln	Lys	Leu	Ala	Phe	Asn
				965					970					975	
Tyr	Gly	Asn	Ala	Asn	Gly	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Lys	Trp	Ile	Phe
				980					985					990	
Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Arg	Leu	Gly	Asp	Ser	Lys	Leu	Tyr	Ile	Asn
							1000					1005			
Gly	Asn	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Gly	Asn	Ile	His
	1010					1015					1020				
Val	Ser	Asp	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Ile	Val	Asn	Cys	Ser	Tyr	Thr	Arg
1025					1030						1035				1040
Tyr	Ile	Gly	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asn	Ile	Phe	Asp	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu
				1045					1050					1055	
Thr	Glu	Ile	Gln	Thr	Leu	Tyr	Ser	Asn	Glu	Pro	Asn	Thr	Asn	Ile	Leu
				1060					1065					1070	
Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Asn	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Asp	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Leu
	1075						1080					1085			
Leu	Asn	Val	Leu	Lys	Pro	Asn	Asn	Phe	Ile	Asp	Arg	Arg	Lys	Asp	Ser
1090						1095					1100				
Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Asn	Ile	Arg	Ser	Thr	Ile	Leu	Leu	Ala	Asn	Arg
1105					1110						1115				1120
Leu	Tyr	Ser	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ile	Gln	Arg	Val	Asn	Asn	Ser	Ser
				1125						1130				1135	
Thr	Asn	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Lys	Asn	Asp	Gln	Val	Tyr	Ile	Asn	Phe
	1140								1145					1150	
Val	Ala	Ser	Lys	Thr	His	Leu	Phe	Pro	Leu	Tyr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr
	1155						1160					1165			
Thr	Asn	Lys	Glu	Lys	Thr	Ile	Lys	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Arg	Phe
	1170					1175					1180				
Asn	Gln	Val	Val	Val	Met	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Asn	Cys	Thr	Met	Asn
1185					1190						1195				1200
Phe	Lys	Asn	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Lys	Ala
				1205					1210					1215	
Asp	Thr	Val	Val	Ala	Ser	Thr	Trp	Tyr	Tyr	Thr	His	Met	Arg	Asp	His
		1220						1225					1230		
Thr	Asn	Ser	Asn	Gly	Cys	Phe	Trp	Asn	Phe	Ile	Ser	Glu	Glu	His	Gly
	1235						1240					1245			
Trp	Gln	Glu	Lys												
	1250														

<210> 6

5 <211> 1274

<212> PRT

10 <213> Clostridium botulinum Serotipo F

<400> 6

ES 2 592 856 T3

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

Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Lys Val Leu Leu Gln Glu Ile Ser
 100 105 110
 Tyr Ala Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Asp His Thr Pro Ile Asp Glu Phe
 115 120 125
 Ser Pro Val Thr Arg Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Leu Ser Thr Asn
 130 135 140
 Val Glu Ser Ser Met Leu Leu Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Asp Ile Phe Glu Ser Cys Cys Tyr Pro Val Arg Lys Leu Ile Asp Pro
 165 170 175
 Asp Val Val Tyr Asp Pro Ser Asn Tyr Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
 180 185 190
 Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu Tyr Thr Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205
 Gly His Asn Ser Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Arg
 225 230 235 240
 Gly Val Thr Tyr Glu Glu Thr Ile Glu Val Lys Gln Ala Pro Leu Met
 245 250 255
 Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270
 Gln Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn
 275 280 285
 Asn Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Ser Glu Val
 290 295 300
 Asn Ser Ala Pro Pro Glu Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe
 305 310 315 320
 Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335
 Asn Glu Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350
 Glu Ser Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 355 360 365
 Phe Ile Lys Tyr Glu Phe Leu Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp
 370 375 380
 Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400
 Asn Arg Gly Gln Ser Ile Lys Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415
 Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Val Lys Phe Cys Lys Ser Val
 420 425 430
 Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val
 435 440 445
 Asn Asn Ser Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu
 450 455 460
 Asn Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Gln Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln
 500 505 510
 Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala
 530 535 540
 Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile
 545 550 555 560
 Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Asp Ile Phe Phe Ser Ser Glu
 565 570 575
 Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile Asp
 580 585 590
 Trp Ile Ser Lys Val Ile Arg Asp Phe Thr Thr Glu Ala Thr Gln Lys

ES 2 592 856 T3

	595					600					605				
Ser	Thr	Val	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Ser	Leu	Ile	Val	Pro	Tyr	Val
	610					615					620				
Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ile	Ile	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Gly	Asn	Phe	Glu
625					630					635					640
Glu	Ala	Phe	Glu	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Pro
				645					650					655	
Glu	Leu	Thr	Ile	Pro	Val	Ile	Leu	Val	Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ile
			660					665						670	
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asn	Lys	Ala	Ile	Lys	Ala	Ile	Asn	Asn	Ser
		675					680					685			
Leu	Ile	Glu	Arg	Glu	Ala	Lys	Trp	Lys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Trp	Ile	Val
690						695					700				
Ser	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Phe	Asn	Lys	Arg	Lys	Glu
705					710					715					720
Gln	Met	Tyr	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Gln	Val	Asp	Ala	Ile	Lys	Thr	Ala
				725					730					735	
Ile	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Asp	Glu	Lys	Asn	Arg	Leu
			740					745						750	
Glu	Ser	Glu	Tyr	Asn	Ile	Asn	Asn	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Asn	Lys	Lys
		755					760					765			
Val	Ser	Leu	Ala	Met	Lys	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Met	Thr	Glu	Ser	Ser
770						775					780				
Ile	Ser	Tyr	Leu	Met	Lys	Leu	Ile	Asn	Glu	Ala	Lys	Val	Gly	Lys	Leu
785					790				795						800
Lys	Lys	Tyr	Asp	Asn	His	Val	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ile	Leu
				805					810					815	
Asp	His	Arg	Ser	Ile	Leu	Gly	Glu	Gln	Thr	Asn	Glu	Leu	Ser	Asp	Leu
			820					825						830	
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Ser	Ser	Ile	Pro	Phe	Glu	Leu	Ser	Ser	Tyr
			835				840					845			
Thr	Asn	Asp	Lys	Ile	Leu	Ile	Ile	Tyr	Phe	Asn	Arg	Leu	Tyr	Lys	Lys
850						855					860				
Ile	Lys	Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Arg	Tyr	Glu	Asn	Asn	Lys	Phe
865					870				875						880
Ile	Asp	Ile	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ser	Asn	Ile	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn	Val
				885					890					895	
Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asn	Arg	Asn	Gln	Phe	Gly	Ile	Tyr	Asn	Ser	Arg
			900					905						910	
Leu	Ser	Glu	Val	Asn	Ile	Ala	Gln	Asn	Asn	Asp	Ile	Ile	Tyr	Asn	Ser
		915					920						925		
Arg	Tyr	Gln	Asn	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe	Trp	Val	Arg	Ile	Pro	Lys	His
930						935					940				
Tyr	Lys	Pro	Met	Asn	His	Asn	Arg	Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met
945					950				955						960
Gly	Asn	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Val	Arg	Asp
				965					970					975	
Cys	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Ser	Gly	Asn	Lys	Glu	Asn
			980					985						990	
Leu	Ile	Phe	Arg	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Arg	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ile	Asn
		995					1000						1005		
Lys	Trp	Ile	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu	Gly	Asn	Ser	Arg
1010						1015							1020		
Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Val	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Asn	Leu
1025					1030					1035					1040
Gly	Asp	Ile	His	Val	Ser	Asp	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Ile	Val	Gly	Cys
				1045					1050					1055	
Asp	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Gly	Ile	Arg	Tyr	Phe	Lys	Val	Phe	Asn	Thr
			1060					1065						1070	
Glu	Leu	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Thr	Leu	Tyr	Ser	Asn	Glu	Pro	Asp
		1075					1080						1085		
Pro	Ser	Ile	Leu	Lys	Asn	Tyr	Trp	Gly	Asn	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Asn	Lys
1090						1095							1100		

ES 2 592 856 T3

Lys Tyr Tyr Leu Phe Asn Leu Leu Arg Lys Asp Lys Tyr Ile Thr Leu
 1105 1110 1115 1120
 Asn Ser Gly Ile Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Thr Glu Gly
 1125 1130 1135
 Ser Val Phe Leu Asn Tyr Lys Leu Tyr Glu Gly Val Glu Val Ile Ile
 1140 1145 1150
 Arg Lys Asn Gly Pro Ile Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg
 1155 1160 1165
 Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Gly Val Glu Tyr
 1170 1175 1180
 Arg Leu Tyr Ala Asp Thr Lys Ser Glu Lys Glu Lys Ile Ile Arg Thr
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Leu Asn Asp Ser Leu Gly Gln Ile Ile Val Met Asp Ser Ile
 1205 1210 1215
 Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn Asn Asn Gly Ser Asn Ile
 1220 1225 1230
 Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr
 1235 1240 1245
 Tyr Asn Asn Ile Arg Arg Asn Thr Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser
 1250 1255 1260
 Ser Ile Ser Lys Glu Asn Gly Trp Lys Glu
 1265 1270

5 <210> 7

<211> 1297

<212> PRT

10

<213> Clostridium botulinum Serotipo G

15 <400> 7

ES 2 592 856 T3

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

ES 2 592 856 T3

			260					265				270			
Gly	Gly	His	Asp	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr	Asp	Met	Asn	Ile
		275					280					285			
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu	Asn
		290				295					300				
Ile	Val	Ser	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Gly	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Gln	Ile	Tyr	Lys	Asn	Lys	Tyr	Asp	Phe	Val	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Lys
				325					330					335	
Tyr	Ser	Val	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ala	Leu	Met
			340					345					350		
Phe	Gly	Phe	Thr	Glu	Thr	Asn	Leu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ile	Lys	Thr
		355					360					365			
Arg	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Tyr	Leu	Pro	Pro	Ile	Lys	Thr	Glu	Lys
		370				375					380				
Leu	Leu	Asp	Asn	Thr	Ile	Tyr	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Phe	Asn	Ile	Ala
385					390					395					400
Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Lys	Ala	Val	Asn
				405					410					415	
Lys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Glu	Ile	Ser	Leu	Glu	His	Leu	Val	Ile	Tyr	Arg
			420					425					430		
Ile	Ala	Met	Cys	Lys	Pro	Val	Met	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu
		435					440					445			
Gln	Cys	Ile	Ile	Val	Asn	Asn	Glu	Asp	Leu	Phe	Phe	Ile	Ala	Asn	Lys
	450				455						460				
Asp	Ser	Phe	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Ala	Tyr	Asn
465					470					475					480
Thr	Gln	Asn	Asn	Thr	Ile	Glu	Asn	Asn	Phe	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu	Ile
				485					490					495	
Leu	Asp	Asn	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Pro	Asn	Glu	Asn	Thr
			500					505					510		
Glu	Pro	Phe	Thr	Asn	Phe	Asp	Asp	Ile	Asp	Ile	Pro	Val	Tyr	Ile	Lys
		515					520					525			
Gln	Ser	Ala	Leu	Lys	Lys	Ile	Phe	Val	Asp	Gly	Asp	Ser	Leu	Phe	Glu
	530				535						540				
Tyr	Leu	His	Ala	Gln	Thr	Phe	Pro	Ser	Asn	Ile	Glu	Asn	Leu	Gln	Leu
545					550					555					560
Thr	Asn	Ser	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Arg	Asn	Asn	Asn	Lys	Val	Tyr	Thr
				565					570					575	
Phe	Phe	Ser	Thr	Asn	Leu	Val	Glu	Lys	Ala	Asn	Thr	Val	Val	Gly	Ala
			580					585					590		
Ser	Leu	Phe	Val	Asn	Trp	Val	Lys	Gly	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Ser
		595					600					605			
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Val	Ser	Asp	Val	Ser	Ile
	610					615						620			
Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala
625					630					635					640
Lys	Glu	Asn	Phe	Lys	Asn	Ala	Phe	Glu	Ile	Gly	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu
				645						650				655	
Met	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Leu	Ile	Val	Pro	Ile	Val	Gly	Phe	Phe	Thr
			660					665					670		
Leu	Glu	Ser	Tyr	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	His	Ile	Ile	Met	Thr	Ile	Ser
		675					680					685			
Asn	Ala	Leu	Lys	Lys	Arg	Asp	Gln	Lys	Trp	Thr	Asp	Met	Tyr	Gly	Leu
	690				695						700				
Ile	Val	Ser	Gln	Trp	Leu	Ser	Thr	Val	Asn	Thr	Gln	Phe	Tyr	Thr	Ile
705					710					715					720
Lys	Glu	Arg	Met	Tyr	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Gln	Ser	Gln	Ala	Ile	Glu
				725						730				735	
Lys	Ile	Ile	Glu	Asp	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	Lys	Met
			740					745					750		
Asn	Ile	Asn	Ile	Asp	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Lys	Leu	Asn	Gln	Ser
		755					760						765		

ES 2 592 856 T3

Ile Asn Leu Ala Ile Asn Asn Ile Asp Asp Phe Ile Asn Gln Cys Ser
 770 775 780
 Ile Ser Tyr Leu Met Asn Arg Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu
 785 790 795 800
 Lys Asp Phe Asp Asp Asn Leu Lys Arg Asp Leu Leu Glu Tyr Ile Asp
 805 810 815
 Thr Asn Glu Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Lys
 820 825 830
 Val Asn Arg His Leu Lys Asp Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Leu Tyr
 835 840 845
 Thr Lys Asp Thr Ile Leu Ile Gln Val Phe Asn Asn Tyr Ile Ser Asn
 850 855 860
 Ile Ser Ser Asn Ala Ile Leu Ser Leu Ser Tyr Arg Gly Gly Arg Leu
 865 870 875 880
 Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val
 885 890 895
 Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu
 900 905 910
 Asn Ser Asn Ile Thr Ala His Gln Ser Lys Phe Val Val Tyr Asp Ser
 915 920 925
 Met Phe Asp Asn Phe Ser Ile Asn Phe Trp Val Arg Thr Pro Lys Tyr
 930 935 940
 Asn Asn Asn Asp Ile Gln Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Tyr Thr Ile Ile
 945 950 955 960
 Ser Cys Ile Lys Asn Asp Ser Gly Trp Lys Val Ser Ile Lys Gly Asn
 965 970 975
 Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Val Asn Ala Lys Ser Lys Ser Ile
 980 985 990
 Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys
 995 1000 1005
 Trp Phe Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asn Ala Asn Ile
 1010 1015 1020
 Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Lys Lys Ser Glu Lys Ile Leu Asn Leu Asp
 1025 1030 1035 1040
 Arg Ile Asn Ser Ser Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Ile Asn Cys Thr
 1045 1050 1055
 Asp Thr Thr Lys Phe Val Trp Ile Lys Asp Phe Asn Ile Phe Gly Arg
 1060 1065 1070
 Glu Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Ser Leu Tyr Trp Ile Gln Ser Ser
 1075 1080 1085
 Thr Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr
 1090 1095 1100
 Gln Tyr Tyr Leu Phe Asn Gln Gly Met Gln Asn Ile Tyr Ile Lys Tyr
 1105 1110 1115 1120
 Phe Ser Lys Ala Ser Met Gly Glu Thr Ala Pro Arg Thr Asn Phe Asn
 1125 1130 1135
 Asn Ala Ala Ile Asn Tyr Gln Asn Leu Tyr Leu Gly Leu Arg Phe Ile
 1140 1145 1150
 Ile Lys Lys Ala Ser Asn Ser Arg Asn Ile Asn Asn Asp Asn Ile Val
 1155 1160 1165
 Arg Glu Gly Asp Tyr Ile Tyr Leu Asn Ile Asp Asn Ile Ser Asp Glu
 1170 1175 1180
 Ser Tyr Arg Val Tyr Val Leu Val Asn Ser Lys Glu Ile Gln Thr Gln
 1185 1190 1195 1200
 Leu Phe Leu Ala Pro Ile Asn Asp Asp Pro Thr Phe Tyr Asp Val Leu
 1205 1210 1215
 Gln Ile Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Thr Thr Tyr Asn Cys Gln Ile Leu
 1220 1225 1230
 Cys Glu Lys Asp Thr Lys Thr Phe Gly Leu Phe Gly Ile Gly Lys Phe
 1235 1240 1245
 Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Val Trp Asp Thr Tyr Asp Asn Tyr Phe Cys
 1250 1255 1260
 Ile Ser Gln Trp Tyr Leu Arg Arg Ile Ser Glu Asn Ile Asn Lys Leu

1265 1270 1275 1280
 Arg Leu Gly Cys Asn Trp Gln Phe Ile Pro Val Asp Glu Gly Trp Thr
 1285 1290 1295
 Glu

<210> 8

<211> 1315

5

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

10

<400> 8

```

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn
 1      5      10      15
Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile
      20      25      30
Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
      35      40      45
Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser
      50      55      60
Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr
      65      70      75      80
Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn
      85      90      95
Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile
      100      105      110
Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe
      115      120      125
Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro
      130      135      140
Ser Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe
      145      150      155      160
Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu
      165      170      175
Arg Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser
      180      185      190
Ile Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn
      195      200      205
Val Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe
      210      215      220
Gln Asp Pro Ala Leu Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His
      225      230      235      240
Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys
      245      250      255
Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu
      260      265      270
Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys
      275      280      285
Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn
      290      295      300
Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp
      305      310      315      320
Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser
      325      330      335
Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn
      340      345      350
Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn
      355      360      365
Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys
      370      375      380
Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe
      385      390      395      400

```

15

Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met
 405 410 415
 Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val
 420 425 430
 Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile
 435 440 445
 Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly
 450 455 460
 Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu
 465 470 475 480
 Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr
 485 490 495
 Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile
 500 505 510
 Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg
 515 520 525
 Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Glu Tyr Lys Ser
 530 535 540
 Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile
 545 550 555 560
 Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile
 565 570 575
 Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile
 580 585 590
 Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln
 595 600 605
 Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr
 610 615 620
 Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser
 625 630 635 640
 Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly
 645 650 655
 Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu
 660 665 670
 Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu
 675 680 685
 Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile
 690 695 700
 Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys
 705 710 715 720
 Leu Val Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys
 725 730 735
 Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile
 740 745 750
 Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys
 755 760 765
 Glu Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu
 770 775 780
 Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser
 785 790 795 800
 Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln
 805 810 815
 Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile
 820 825 830
 Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu
 835 840 845
 Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser
 850 855 860
 Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile
 865 870 875 880
 Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile
 885 890 895
 Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala

ES 2 592 856 T3

			900					905				910			
Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Ile	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	His	Leu	Val	Asn	Asn
		915					920					925			
Glu	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Val	His	Lys	Ala	Met	Asp	Ile	Glu	Tyr	Asn
		930					935					940			
Asp	Met	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val	Pro	Lys
945					950					955					960
Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Gln	Tyr	Gly	Thr	Asn	Glu	Tyr	Ser	Ile
				965					970						975
Ile	Ser	Ser	Met	Lys	Lys	His	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Gly	Trp	Ser
			980					985						990	
Val	Ser	Leu	Lys	Gly	Asn	Asn	Leu	Ile	Trp	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Ala
		995					1000					1005			
Gly	Glu	Val	Arg	Gln	Ile	Thr	Phe	Arg	Asp	Leu	Pro	Asp	Lys	Phe	Asn
		1010				1015					1020				
Ala	Tyr	Leu	Ala	Asn	Lys	Trp	Val	Phe	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Arg
1025						1030					1035				1040
Leu	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gly	Val	Leu	Met	Gly	Ser	Ala
						1045			1050						1055
Glu	Ile	Thr	Gly	Leu	Gly	Ala	Ile	Arg	Glu	Asp	Asn	Asn	Ile	Thr	Leu
			1060					1065							1070
Lys	Leu	Asp	Arg	Cys	Asn	Asn	Asn	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Ile	Asp	Lys
		1075					1080								1085
Phe	Arg	Ile	Phe	Cys	Lys	Ala	Leu	Asn	Pro	Lys	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu
		1090				1095					1100				
Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	Leu	Arg	Asp	Phe	Trp	Gly	Asn
1105						1110					1115				1120
Pro	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Ser
						1125					1130				1135
Ser	Lys	Asp	Val	Gln	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr
			1140					1145							1150
Asn	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Arg
		1155					1160								1165
Leu	Tyr	Asn	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn
		1170					1175								1180
Glu	Ile	Asp	Ser	Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Phe	Ile	Lys	Leu	Tyr	Val
1185						1190					1195				1200
Ser	Tyr	Asn	Asn	Asn	Glu	His	Ile	Val	Gly	Tyr	Pro	Lys	Asp	Gly	Asn
						1205					1210				1215
Ala	Phe	Asn	Asn	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Tyr	Asn	Ala	Pro
						1220					1225				1230
Gly	Ile	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Met	Glu	Ala	Val	Lys	Leu	Arg	Asp	Leu
							1240								1245
Lys	Thr	Tyr	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Lys	Asn	Ala	Ser
						1250									1255
Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Thr	His	Asn	Gly	Gln	Ile	Gly	Asn	Asp	Pro	Asn
1265						1270					1275				1280
Arg	Asp	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asn	His	Leu	Lys	Asp
						1285					1290				1295
Lys	Ile	Leu	Gly	Cys	Asp	Trp	Tyr	Phe	Val	Pro	Thr	Asp	Glu	Gly	Trp
						1300					1305				1310
Thr	Asn	Asp													
		1315													

- 5 <210> 9
- <211> 1268
- <212> PRT
- 10 <213> Clostridium baratii

<400> 9

Met	Pro	Val	Asn	Ile	Asn	Asn	Phe	Asn	Tyr	Asn	Asp	Pro	Ile	Asn	Asn
1				5					10					15	
Thr	Thr	Ile	Leu	Tyr	Met	Lys	Met	Pro	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Asn	Lys
			20					25					30		
Tyr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Glu	Ile	Met	Asp	Asn	Val	Trp	Ile	Ile	Pro	Glu
		35					40					45			
Arg	Asn	Ile	Ile	Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Pro	Ile	Ser
	50				55						60				
Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Asn	Tyr	Leu	Thr	Thr
65					70					75					80
Asp	Ala	Glu	Lys	Asp	Arg	Phe	Leu	Lys	Thr	Val	Ile	Lys	Leu	Phe	Asn
				85					90					95	
Arg	Ile	Asn	Ser	Asn	Pro	Ala	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
Asn	Gly	Lys	Pro	Tyr	Leu	Gly	Asn	Asp	His	Thr	Ala	Val	Asn	Glu	Phe
		115					120					125			
Cys	Ala	Asn	Asn	Arg	Ser	Thr	Ser	Val	Glu	Ile	Lys	Glu	Ser	Asn	Gly
		130				135					140				
Thr	Thr	Asp	Ser	Met	Leu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Pro	Gly	Pro
145					150					155					160
Asn	Ile	Leu	Glu	Cys	Ser	Thr	Phe	Pro	Val	Arg	Ile	Phe	Pro	Asn	Asn
				165					170					175	
Ile	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ser	Glu	Lys	Gly	Phe	Gly	Ser	Ile	Gln	Leu	Met
			180					185					190		
Ser	Phe	Ser	Thr	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Phe	Asn	Asp	Asn	Thr	Asp	Leu
		195					200					205			
Phe	Ile	Ala	Asp	Pro	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	His	Glu	Leu	Ile	His	Val
		210				215					220				
Leu	His	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Lys	Val	Ile
225					230					235					240
Glu	Val	Asp	Gln	Gly	Ala	Leu	Met	Ala	Ala	Glu	Lys	Asp	Ile	Lys	Ile
			245					250						255	
Glu	Glu	Phe	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Gln	Asp	Leu	Asn	Ile	Ile	Thr	Asn
			260					265						270	
Ser	Thr	Asn	Gln	Lys	Ile	Tyr	Val	Ile	Leu	Leu	Ser	Asn	Tyr	Thr	Ala
		275					280					285			
Ile	Ala	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Val	Asn	Arg	Asn	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn
		290				295					300				
Thr	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Phe	Phe	Gln	Trp	Lys	Tyr	Gly	Leu	Asp	Gln
305					310					315					320
Asp	Ser	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Asn	Ile	Ser	Lys	Phe	Asn	Ala	Ile
			325						330					335	
Tyr	Lys	Lys	Leu	Phe	Ser	Phe	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Ala	Gln	Lys	Phe
			340					345					350		
Gln	Val	Lys	Asn	Arg	Ser	Asn	Tyr	Leu	Phe	His	Phe	Lys	Pro	Phe	Arg
		355					360					365			
Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Asp	Asp	Asn	Ile	Tyr	Ser	Ile	Ser	Glu	Gly	Phe
		370				375					380				
Asn	Ile	Gly	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Asn	Asn	Gly	Gln	Asn	Ile	Asn	Leu
385					390						395				400
Asn	Ser	Arg	Ile	Val	Gly	Pro	Ile	Pro	Asp	Asn	Gly	Leu	Val	Glu	Arg
			405						410					415	
Phe	Val	Gly	Leu	Cys	Lys	Ser	Ile	Val	Ser	Lys	Lys	Gly	Thr	Lys	Asn
			420					425						430	
Ser	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Arg	Asp	Leu	Phe	Phe	Val	Ala	Ser
		435					440					445			
Glu	Ser	Ser	Tyr	Asn	Glu	Asn	Gly	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Glu	Ile	Asp
			450			455					460				
Asp	Thr	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Val
465					470					475					480
Ile	Leu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Asp	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu
				485					490					495	
Leu	Asn	Thr	Thr	Ala	Gln	Asn	Asp	Ser	Tyr	Val	Pro	Lys	Tyr	Asp	Ser
			500					505					510		
Asn	Gly	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Tyr	Thr	Val	Asp	Lys	Leu	Asn	Val

	515					520						525			
Phe	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Ala	Pro	Glu	Gly	Glu	Ser	Ala	Ile
	530					535					540				
Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Val	Asn	Thr	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Ser	Lys	Val
545					550					555					560
Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Phe	Ile	Asn	Thr	Val	Asn	Lys	Pro	Val
				565					570						575
Gln	Ala	Ala	Leu	Phe	Ile	Ser	Trp	Ile	Gln	Gln	Val	Ile	Asn	Asp	Phe
			580					585					590		
Thr	Thr	Glu	Ala	Thr	Gln	Lys	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile
		595					600					605			
Ser	Leu	Ile	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Glu
	610					615						620			
Val	Gln	Lys	Gly	Asn	Phe	Lys	Glu	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly
625					630					635					640
Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Pro	Glu	Leu	Leu	Ile	Pro	Thr	Ile	Leu	Val
				645					650						655
Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Phe	Ile	Asn	Ser	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Lys	Ile
			660					665					670		
Ile	Lys	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Leu	Arg	Glu	Arg	Glu	Leu	Lys	Trp	Lys
		675					680						685		
Glu	Val	Tyr	Ser	Trp	Ile	Val	Ser	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Ile	Asn	Thr
	690					695						700			
Gln	Phe	Asn	Lys	Arg	Lys	Glu	Gln	Met	Tyr	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Gln
705					710					715					720
Val	Asp	Gly	Ile	Lys	Lys	Ile	Ile	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Thr
				725					730						735
Leu	Asp	Glu	Lys	Asn	Arg	Leu	Arg	Ala	Glu	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Ser	Ile
			740					745						750	
Lys	Glu	Glu	Leu	Asn	Lys	Lys	Val	Ser	Leu	Ala	Met	Gln	Asn	Ile	Asp
	755						760						765		
Arg	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	Ser	Tyr	Leu	Met	Lys	Leu	Ile	Asn
	770					775						780			
Glu	Ala	Lys	Ile	Asn	Lys	Leu	Ser	Glu	Tyr	Asp	Lys	Arg	Val	Asn	Gln
785					790					795					800
Tyr	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ile	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Thr	Ser
			805						810						815
Ser	Val	Pro	Glu	Leu	Asn	Asn	Leu	Val	Ser	Asn	Thr	Leu	Asn	Asn	Ser
			820					825						830	
Ile	Pro	Phe	Glu	Leu	Ser	Glu	Tyr	Thr	Asn	Asp	Lys	Ile	Leu	Ile	His
	835						840						845		
Ile	Leu	Ile	Arg	Phe	Tyr	Lys	Arg	Ile	Ile	Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Asn
	850					855						860			
Met	Lys	Tyr	Glu	Asn	Asn	Arg	Phe	Ile	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ser
865					870					875					880
Asn	Ile	Ser	Ile	Asn	Gly	Asp	Ile	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asn	Arg	Asn
				885						890					895
Gln	Phe	Gly	Ile	Tyr	Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Val	Asn	Ile	Thr	Gln
			900					905						910	
Asn	Asn	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asn	Ser	Arg	Tyr	Gln	Asn	Phe	Ser	Val	Ser
		915					920						925		
Phe	Trp	Val	Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Leu	Asn	Asn
	930					935						940			
Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Arg	Asn	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys
945					950					955					960
Ile	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Thr
				965					970						975
Gly	Asn	Asn	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Asn	Tyr	Thr	Gln	Met	Ile	Asp	Ile
			980					985							990
Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Lys	Trp	Thr	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg
		995					1000						1005		
Leu	Gly	His	Ser	Lys	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gly	Asn	Leu	Thr	Asp	Gln	Lys
	1010						1015								

ES 2 592 856 T3

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

<210> 10

5 <211> 1251

<212> PRT

<213> Clostridium butyricum

10

<400> 10

ES 2 592 856 T3

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

			180					185				190			
Arg	Phe	Lys	Asp	Asn	Ser	Met	Asn	Glu	Phe	Ile	Gln	Asp	Pro	Ala	Leu
		195					200					205			
Thr	Leu	Met	His	Glu	Leu	Ile	His	Ser	Leu	His	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ala
	210					215					220				
Lys	Gly	Ile	Thr	Thr	Lys	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gln	Lys	Gln	Asn	Pro	Leu
225					230					235					240
Ile	Thr	Asn	Ile	Arg	Gly	Thr	Asn	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Thr	Phe	Gly
				245					250					255	
Gly	Thr	Asp	Leu	Asn	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Gln	Ser	Asn	Asp	Ile	Tyr
			260					265					270		
Thr	Asn	Leu	Leu	Ala	Asp	Tyr	Lys	Lys	Ile	Ala	Ser	Lys	Leu	Ser	Lys
		275					280					285			
Val	Gln	Val	Ser	Asn	Pro	Leu	Leu	Asn	Pro	Tyr	Lys	Asp	Val	Phe	Glu
	290					295						300			
Ala	Lys	Tyr	Gly	Leu	Asp	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Val	Asn
305					310					315					320
Ile	Asn	Lys	Phe	Asn	Asp	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Tyr	Ser	Phe	Thr	Glu
				325					330					335	
Phe	Asp	Leu	Ala	Thr	Lys	Phe	Gln	Val	Lys	Cys	Arg	Gln	Thr	Tyr	Ile
				340				345					350		
Gly	Gln	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	Leu	Asn	Asp	Ser	Ile
		355					360					365			
Tyr	Asn	Ile	Ser	Glu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Val	Asn	Phe
	370					375						380			
Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Asn	Leu	Asn	Pro	Arg	Ile	Ile	Thr	Pro	Ile	Thr
385					390					395					400
Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Lys	Lys	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Lys	Asn	Ile	Val
				405					410					415	
Ser	Val	Lys	Gly	Ile	Arg	Lys	Ser	Ile	Cys	Ile	Glu	Ile	Asn	Asn	Gly
			420					425					430		
Glu	Leu	Phe	Val	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Tyr	Asn	Asp	Asp	Asn	Ile	
		435					440					445			
Asn	Thr	Pro	Lys	Glu	Ile	Asp	Asp	Thr	Val	Thr	Ser	Asn	Asn	Asn	Tyr
	450					455						460			
Glu	Asn	Asp	Leu	Asp	Gln	Val	Ile	Leu	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu	Ser	Ala
465				470						475					480
Pro	Gly	Leu	Ser	Asp	Glu	Lys	Leu	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln	Asn	Asp	Ala
				485					490					495	
Tyr	Ile	Pro	Lys	Tyr	Asp	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Asp	Ile	Glu	Gln	His
			500					505					510		
Asp	Val	Asn	Glu	Leu	Asn	Val	Phe	Tyr	Leu	Asp	Ala	Gln	Lys	Val	
		515					520					525			
Pro	Glu	Gly	Glu	Asn	Asn	Val	Asn	Leu	Thr	Ser	Ser	Ile	Asp	Thr	Ala
	530					535						540			
Leu	Leu	Glu	Gln	Pro	Lys	Ile	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Glu	Phe	Ile
545					550					555					560
Asn	Asn	Val	Asn	Lys	Pro	Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Trp	Ile
				565					570					575	
Gln	Gln	Val	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Lys	Ser	Thr
				580					585				590		
Val	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Ser	Ile	Val	Val	Pro	Tyr	Ile	Gly	Leu
		595					600					605			
Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Glu	Ala	Gln	Lys	Gly	Asn	Phe	Lys	Asp	Ala
	610					615					620				
Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Pro	Glu	Leu
625				630						635					640
Leu	Ile	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Phe	Leu	Gly	Ser
				645					650					655	
Ser	Asp	Asn	Lys	Asn	Lys	Val	Ile	Lys	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Leu	Lys
			660					665					670		
Glu	Arg	Asp	Glu	Lys	Trp	Lys	Glu	Val	Tyr	Ser	Phe	Ile	Val	Ser	Asn
		675					680						685		

ES 2 592 856 T3

Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met
 690 695 700
 Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Leu Lys Ala Ile Ile Glu
 705 710 715 720
 Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn
 725 730 735
 Lys Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750
 Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asp Tyr Ile Ile Lys His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Ile
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940
 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960
 Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ser Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975
 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Gly Asn Leu Ile Asp Lys Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His
 1010 1015 1020
 Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu Leu Asp Glu
 1045 1050 1055
 Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Asn Asn Glu Pro Asn Ala Asn Ile Leu
 1060 1065 1070
 Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu
 1075 1080 1085
 Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asn Arg Arg Thr Asp Ser
 1090 1095 1100
 Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg
 1105 1110 1115 1120
 Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser
 1125 1130 1135
 Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe
 1140 1145 1150
 Val Ala Ser Lys Thr His Leu Leu Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr
 1155 1160 1165
 Thr Asn Lys Glu Lys Thr Ile Lys Ile Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe
 1170 1175 1180
 Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Cys Thr Met Asn Phe

ES 2 592 856 T3

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

<210> 11

5 <211> 1035

<212> PRT

10 <213> Bos taurus

<400> 11

ES 2 592 856 T3

Met Gly Ser Lys Arg Ser Val Pro Ser Arg His Arg Ser Leu Thr Thr
1 5 10 15
Tyr Glu Val Met Phe Ala Val Leu Phe Val Ile Leu Val Ala Leu Cys
20 25 30
Ala Gly Leu Ile Ala Val Ser Trp Leu Ser Ile Gln Gly Ser Val Lys
35 40 45
Asp Ala Ala Phe Gly Lys Ser His Glu Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile
50 55 60
Ile Ser Gly Ala Thr Tyr Asn Pro His Leu Gln Asp Lys Leu Ser Val
65 70 75 80
Asp Phe Lys Val Leu Ala Phe Asp Ile Gln Gln Met Ile Asp Asp Ile
85 90 95
Phe Gln Ser Ser Asn Leu Lys Asn Glu Tyr Lys Asn Ser Arg Val Leu
100 105 110
Gln Phe Glu Asn Gly Ser Ile Ile Val Ile Phe Asp Leu Leu Phe Asp
115 120 125
Gln Trp Val Ser Asp Lys Asn Val Lys Glu Glu Leu Ile Gln Gly Ile
130 135 140
Glu Ala Asn Lys Ser Ser Gln Leu Val Thr Phe His Ile Asp Leu Asn
145 150 155 160
Ser Ile Asp Ile Thr Ala Ser Leu Glu Asn Phe Ser Thr Ile Ser Pro
165 170 175
Ala Thr Thr Ser Glu Lys Leu Thr Thr Ser Ile Pro Leu Ala Thr Pro
180 185 190
Gly Asn Val Ser Ile Glu Cys Pro Pro Asp Ser Arg Leu Cys Ala Asp
195 200 205
Ala Leu Lys Cys Ile Ala Ile Asp Leu Phe Cys Asp Gly Glu Leu Asn
210 215 220
Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Asp Asn Lys Thr Cys Ala Thr Ala Cys
225 230 235 240
Asp Gly Arg Phe Leu Leu Thr Gly Ser Ser Gly Ser Phe Glu Ala Leu
245 250 255
His Tyr Pro Lys Pro Ser Asn Asn Thr Ser Ala Val Cys Arg Trp Ile
260 265 270
Ile Arg Val Asn Gln Gly Leu Ser Ile Gln Leu Asn Phe Asp Tyr Phe
275 280 285
Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Leu Asn Ile Tyr Glu Gly Met Gly Ser
290 295 300
Ser Lys Ile Leu Arg Ala Ser Leu Trp Ser Asn Asn Pro Gly Ile Ile
305 310 315 320
Arg Ile Phe Ser Asn Gln Val Thr Ala Thr Phe Leu Ile Gln Ser Asp
325 330 335
Glu Ser Asp Tyr Ile Gly Phe Lys Val Thr Tyr Thr Ala Phe Asn Ser
340 345 350
Lys Glu Leu Asn Asn Tyr Glu Lys Ile Asn Cys Asn Phe Glu Asp Gly
355 360 365

ES 2 592 856 T3

Phe Cys Phe Trp Ile Gln Asp Leu Asn Asp Asp Asn Glu Trp Glu Arg
 370 375 380
 Thr Gln Gly Ser Thr Phe Pro Pro Ser Thr Gly Pro Thr Phe Asp His
 385 390 395 400
 Thr Phe Gly Asn Glu Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Thr Pro Thr Gly Pro
 405 410 415
 Gly Gly Arg Arg Glu Arg Val Gly Leu Leu Thr Leu Pro Leu Asp Pro
 420 425 430
 Thr Pro Glu Gln Ala Cys Leu Ser Phe Trp Tyr Tyr Met Tyr Gly Glu
 435 440 445
 Asn Val Tyr Lys Leu Ser Ile Asn Ile Ser Ser Asp Gln Asn Met Glu
 450 455 460
 Lys Thr Ile Phe Gln Lys Glu Gly Asn Tyr Gly Gln Asn Trp Asn Tyr
 465 470 475 480
 Gly Gln Val Thr Leu Asn Glu Thr Val Glu Phe Lys Val Ser Phe Tyr
 485 490 495
 Gly Phe Lys Asn Gln Ile Leu Ser Asp Ile Ala Leu Asp Asp Ile Ser
 500 505 510
 Leu Thr Tyr Gly Ile Cys Asn Val Ser Val Tyr Pro Glu Pro Thr Leu
 515 520 525
 Val Pro Thr Pro Pro Pro Glu Leu Pro Thr Asp Cys Gly Gly Pro His
 530 535 540
 Asp Leu Trp Glu Pro Asn Thr Thr Phe Thr Ser Ile Asn Phe Pro Asn
 545 550 555 560
 Ser Tyr Pro Asn Gln Ala Phe Cys Ile Trp Asn Leu Asn Ala Gln Lys
 565 570 575
 Gly Lys Asn Ile Gln Leu His Phe Gln Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ile
 580 585 590
 Ala Asp Val Val Glu Ile Arg Asp Gly Glu Gly Asp Asp Ser Leu Phe
 595 600 605
 Leu Ala Val Tyr Thr Gly Pro Gly Pro Val Asn Asp Val Phe Ser Thr
 610 615 620
 Thr Asn Arg Met Thr Val Leu Phe Ile Thr Asp Asn Met Leu Ala Lys
 625 630 635 640
 Gln Gly Phe Lys Ala Asn Phe Thr Thr Gly Tyr Gly Leu Gly Ile Pro
 645 650 655
 Glu Pro Cys Lys Glu Asp Asn Phe Gln Cys Lys Asp Gly Glu Cys Ile
 660 665 670
 Pro Leu Val Asn Leu Cys Asp Gly Phe Pro His Cys Lys Asp Gly Ser
 675 680 685
 Asp Glu Ala His Cys Val Arg Leu Phe Asn Gly Thr Thr Asp Ser Ser
 690 695 700
 Gly Leu Val Gln Phe Arg Ile Gln Ser Ile Trp His Val Ala Cys Ala
 705 710 715 720
 Glu Asn Trp Thr Thr Gln Ile Ser Asp Asp Val Cys Gln Leu Leu Gly
 725 730 735
 Leu Gly Thr Gly Asn Ser Ser Val Pro Thr Phe Ser Thr Gly Gly Gly
 740 745 750
 Pro Tyr Val Asn Leu Asn Thr Ala Pro Asn Gly Ser Leu Ile Leu Thr
 755 760 765
 Pro Ser Gln Gln Cys Leu Glu Asp Ser Leu Ile Leu Leu Gln Cys Asn
 770 775 780
 Tyr Lys Ser Cys Gly Lys Lys Leu Val Thr Gln Glu Val Ser Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Val Gly Gly Ser Asp Ser Arg Glu Gly Ala Trp Pro Trp Val Val
 805 810 815
 Ala Leu Tyr Phe Asp Asp Gln Gln Val Cys Gly Ala Ser Leu Val Ser
 820 825 830
 Arg Asp Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Val Tyr Gly Arg Asn Met
 835 840 845
 Glu Pro Ser Lys Trp Lys Ala Val Leu Gly Leu His Met Ala Ser Asn
 850 855 860
 Leu Thr Ser Pro Gln Ile Glu Thr Arg Leu Ile Asp Gln Ile Val Ile

ES 2 592 856 T3

```

865          870          875          880
Asn Pro His Tyr Asn Lys Arg Arg Lys Asn Asn Asp Ile Ala Met Met
      885          890          895
His Leu Glu Met Lys Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Gln Pro Ile Cys
      900          905          910
Leu Pro Glu Glu Asn Gln Val Phe Pro Pro Gly Arg Ile Cys Ser Ile
      915          920          925
Ala Gly Trp Gly Ala Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Thr Ala Asp Val Leu
      930          935          940
Gln Glu Ala Asp Val Pro Leu Leu Ser Asn Glu Lys Cys Gln Gln Gln
945          950          955          960
Met Pro Glu Tyr Asn Ile Thr Glu Asn Met Val Cys Ala Gly Tyr Glu
      965          970          975
Ala Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met
      980          985          990
Cys Gln Glu Asn Asn Arg Trp Leu Leu Ala Gly Val Thr Ser Phe Gly
      995          1000          1005
Tyr Gln Cys Ala Leu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Pro
1010          1015          1020
Arg Phe Thr Glu Trp Ile Gln Ser Phe Leu His
1025          1030          1035

```

<210> 12

5 <211> 183

<212> PRT

10 <213> Rinovirus humano C

<400> 12

```

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

```

15 <210> 13

20 <211> 183

<212> PRT

<213> Enterovirus humano 71

<221> característica_misc

<222> 124

5 <223> Xaa es desconocido u otro

<400> 13

10

```

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

<210> 14

15 <211> 3054

<212> PRT

20 <213> Potivirus

<400> 14

ES 2 592 856 T3

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

ES 2 592 856 T3

Arg Ile Asp Asn Trp Gln Gln Glu Thr Leu Leu Asp Leu Ala Lys Arg
 225 230 235 240
 Phe Lys Asn Glu Arg Val Asp Gln Ser Lys Leu Thr Phe Gly Ser Ser
 245 250 255
 Gly Leu Val Leu Arg Gln Gly Ser Tyr Gly Pro Ala His Trp Tyr Arg
 260 265 270
 His Gly Met Phe Ile Val Arg Gly Arg Ser Asp Gly Met Leu Val Asp
 275 280 285
 Ala Arg Ala Lys Val Thr Phe Ala Val Cys His Ser Met Thr His Tyr
 290 295 300
 Ser Asp Lys Ser Ile Ser Glu Ala Phe Phe Ile Pro Tyr Ser Lys Lys
 305 310 315 320
 Phe Leu Glu Leu Arg Pro Asp Gly Ile Ser His Glu Cys Thr Arg Gly
 325 330 335
 Val Ser Val Glu Arg Cys Gly Glu Val Ala Ala Ile Leu Thr Gln Ala
 340 345 350
 Leu Ser Pro Cys Gly Lys Ile Thr Cys Lys Arg Cys Met Val Glu Thr
 355 360 365
 Pro Asp Ile Val Glu Gly Glu Ser Gly Glu Ser Val Thr Asn Gln Gly
 370 375 380
 Lys Leu Leu Ala Met Leu Lys Glu Gln Tyr Pro Asp Phe Pro Met Ala
 385 390 395 400
 Glu Lys Leu Leu Thr Arg Phe Leu Gln Gln Lys Ser Leu Val Asn Thr
 405 410 415
 Asn Leu Thr Ala Cys Val Ser Val Lys Gln Leu Ile Gly Asp Arg Lys
 420 425 430
 Gln Ala Pro Phe Thr His Val Leu Ala Val Ser Glu Ile Leu Phe Lys
 435 440 445
 Gly Asn Lys Leu Thr Gly Ala Asp Leu Glu Glu Ala Ser Thr His Met
 450 455 460
 Leu Glu Ile Ala Arg Phe Leu Asn Asn Arg Thr Glu Asn Met Arg Ile
 465 470 475 480
 Gly His Leu Gly Ser Phe Arg Asn Lys Ile Ser Ser Lys Ala His Val
 485 490 495
 Asn Asn Ala Leu Met Cys Asp Asn Gln Leu Asp Gln Asn Gly Asn Phe
 500 505 510
 Ile Trp Gly Leu Arg Gly Ala His Ala Lys Arg Phe Leu Lys Gly Phe
 515 520 525
 Phe Thr Glu Ile Asp Pro Asn Glu Gly Tyr Asp Lys Tyr Val Ile Arg
 530 535 540
 Lys His Ile Arg Gly Ser Arg Lys Leu Ala Ile Gly Asn Leu Ile Met
 545 550 555 560
 Ser Thr Asp Phe Gln Thr Leu Arg Gln Gln Ile Gln Gly Glu Thr Ile
 565 570 575
 Glu Arg Lys Glu Ile Gly Asn His Cys Ile Ser Met Arg Asn Gly Asn
 580 585 590
 Tyr Val Tyr Pro Cys Cys Cys Val Thr Leu Glu Asp Gly Lys Ala Gln
 595 600 605
 Tyr Ser Asp Leu Lys His Pro Thr Lys Arg His Leu Val Ile Gly Asn
 610 615 620
 Ser Gly Asp Ser Lys Tyr Leu Asp Leu Pro Val Leu Asn Glu Glu Lys
 625 630 635 640
 Met Tyr Ile Ala Asn Glu Gly Tyr Cys Tyr Met Asn Ile Phe Phe Ala
 645 650 655
 Leu Leu Val Asn Val Lys Glu Glu Asp Ala Lys Asp Phe Thr Lys Phe
 660 665 670
 Ile Arg Asp Thr Ile Val Pro Lys Leu Gly Ala Trp Pro Thr Met Gln
 675 680 685
 Asp Val Ala Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Asp Val
 690 695 700
 Leu Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile Leu Val Asp His Asp Asn Lys Thr
 705 710 715 720
 Met His Val Leu Asp Ser Tyr Gly Ser Arg Thr Thr Gly Tyr His Met

Ser Glu Ile Ser His Ser Pro Ala Arg Asp Phe Leu Val Arg Gly Ala
 1235 1240 1245
 Val Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gly Leu Pro Tyr His Leu Ser Lys Arg
 1250 1255 1260
 Gly Arg Val Leu Met Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu Thr Asp Asn Met
 1265 1270 1275 1280
 His Lys Gln Leu Arg Ser Glu Pro Phe Asn Cys Phe Pro Thr Leu Arg
 1285 1290 1295
 Met Arg Gly Lys Ser Thr Phe Gly Ser Ser Pro Ile Thr Val Met Thr
 1300 1305 1310
 Ser Gly Phe Ala Leu His His Phe Ala Arg Asn Ile Ala Glu Val Lys
 1315 1320 1325
 Thr Tyr Asp Phe Val Ile Ile Asp Glu Cys His Val Asn Asp Ala Ser
 1330 1335 1340
 Ala Ile Ala Phe Arg Asn Leu Leu Phe Glu His Glu Phe Glu Gly Lys
 1345 1350 1355 1360
 Val Leu Lys Val Ser Ala Thr Pro Pro Gly Arg Glu Val Glu Phe Thr
 1365 1370 1375
 Thr Gln Phe Pro Val Lys Leu Lys Ile Glu Glu Ala Leu Ser Phe Gln
 1380 1385 1390
 Glu Phe Val Ser Leu Gln Gly Thr Gly Ala Asn Ala Asp Val Ile Ser
 1395 1400 1405
 Cys Gly Asp Asn Ile Leu Val Tyr Val Ala Ser Tyr Asn Asp Val Asp
 1410 1415 1420
 Ser Leu Gly Lys Leu Leu Val Gln Lys Gly Tyr Lys Val Ser Lys Ile
 1425 1430 1435 1440
 Asp Gly Arg Thr Met Lys Ser Gly Gly Thr Glu Ile Ile Thr Glu Gly
 1445 1450 1455
 Thr Ser Val Lys Lys His Phe Ile Val Ala Thr Asn Ile Ile Glu Asn
 1460 1465 1470
 Gly Val Thr Ile Asp Ile Asp Val Val Val Asp Phe Gly Thr Lys Val
 1475 1480 1485
 Val Pro Val Leu Asp Val Asp Asn Arg Ala Val Gln Tyr Asn Lys Thr
 1490 1495 1500
 Val Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ile Gln Lys Leu Gly Arg Val Gly Arg
 1505 1510 1515 1520
 His Lys Glu Gly Val Ala Leu Arg Ile Gly Gln Thr Asn Lys Thr Leu
 1525 1530 1535
 Val Glu Ile Pro Glu Met Val Ala Thr Glu Ala Ala Phe Leu Cys Phe
 1540 1545 1550
 Met Tyr Asn Leu Pro Val Thr Thr Gln Ser Val Ser Thr Thr Leu Leu
 1555 1560 1565
 Glu Asn Ala Thr Leu Leu Gln Ala Arg Thr Met Ala Gln Phe Glu Leu
 1570 1575 1580
 Ser Tyr Phe Tyr Thr Ile Asn Phe Val Arg Phe Asp Gly Ser Met His
 1585 1590 1595 1600
 Pro Val Ile His Asp Lys Leu Lys Arg Phe Lys Leu His Thr Cys Glu
 1605 1610 1615
 Thr Phe Leu Asn Lys Leu Ala Ile Pro Asn Lys Gly Leu Ser Ser Trp
 1620 1625 1630
 Leu Thr Ser Gly Glu Tyr Lys Arg Leu Gly Tyr Ile Ala Glu Asp Ala
 1635 1640 1645
 Gly Ile Arg Ile Pro Phe Val Cys Lys Glu Ile Pro Asp Ser Leu His
 1650 1655 1660
 Glu Glu Ile Trp His Ile Val Val Ala His Lys Gly Asp Ser Gly Ile
 1665 1670 1675 1680
 Gly Arg Leu Thr Ser Val Gln Ala Ala Lys Val Val Tyr Thr Leu Gln
 1685 1690 1695
 Thr Asp Val His Ser Ile Ala Arg Thr Leu Ala Cys Ile Asn Arg Arg
 1700 1705 1710
 Ile Ala Asp Glu Gln Met Lys Gln Ser His Phe Glu Ala Ala Thr Gly
 1715 1720 1725
 Arg Ala Phe Ser Phe Thr Asn Tyr Ser Ile Gln Ser Ile Phe Asp Thr

ES 2 592 856 T3

1730		1735		1740
Leu Lys Ala Asn Tyr	Ala Thr Lys His Thr	Lys Glu Asn Ile Ala Val		
1745	1750	1755		1760
Leu Gln Gln Ala Lys Asp	Gln Leu Leu Glu Phe Ser	Asn Leu Ala Lys		
	1765	1770		1775
Asp Gln Asp Val Thr Gly	Ile Ile Gln Asp Phe Asn His	Leu Glu Thr		
	1780	1785		1790
Ile Tyr Leu Gln Ser Asp	Ser Glu Val Ala Lys His	Leu Lys Leu Lys		
	1795	1800		1805
Ser His Trp Asn Lys Ser	Gln Ile Thr Arg Asp	Ile Ile Ile Ala Leu		
	1810	1815		1820
Ser Val Leu Ile Gly Gly	Gly Trp Met Leu Ala Thr	Tyr Phe Lys Asp		
1825	1830	1835		1840
Lys Phe Asn Glu Pro Val	Tyr Phe Gln Gly Lys Lys	Asn Gln Lys His		
	1845	1850		1855
Lys Leu Lys Met Arg Glu	Ala Arg Gly Ala Arg Gly	Gln Tyr Glu Val		
	1860	1865		1870
Ala Ala Glu Pro Glu Ala	Leu Glu His Tyr Phe Gly	Ser Ala Tyr Asn		
	1875	1880		1885
Asn Lys Gly Lys Arg Lys	Gly Thr Thr Arg Gly Met	Gly Ala Lys Ser		
	1890	1895		1900
Arg Lys Phe Ile Asn Met	Tyr Gly Phe Asp Pro Thr	Asp Phe Ser Tyr		
1905	1910	1915		1920
Ile Arg Phe Val Asp Pro	Leu Thr Gly His Thr Ile	Asp Glu Ser Thr		
	1925	1930		1935
Asn Ala Pro Ile Asp Leu	Val Gln His Glu Phe Gly	Lys Val Arg Thr		
	1940	1945		1950
Arg Met Leu Ile Asp Asp	Glu Ile Glu Pro Gln Ser	Leu Ser Thr His		
	1955	1960		1965
Thr Thr Ile His Ala Tyr	Leu Val Asn Ser Gly Thr	Lys Lys Val Leu		
	1970	1975		1980
Lys Val Asp Leu Thr Pro	His Ser Ser Leu Arg Ala	Ser Glu Lys Ser		
1985	1990	1995		2000
Thr Ala Ile Met Gly Phe	Pro Glu Arg Glu Asn Glu	Leu Arg Gln Thr		
	2005	2010		2015
Gly Met Ala Val Pro Val	Ala Tyr Asp Gln Leu Pro	Pro Lys Asn Glu		
	2020	2025		2030
Asp Leu Thr Phe Glu Gly	Glu Ser Leu Phe Lys Gly	Pro Arg Asp Tyr		
	2035	2040		2045
Asn Pro Ile Ser Ser Thr	Ile Cys His Leu Thr Asn	Glu Ser Asp Gly		
	2050	2055		2060
His Thr Thr Ser Leu Tyr	Gly Ile Gly Phe Gly Pro	Phe Ile Ile Thr		
2065	2070	2075		2080
Asn Lys His Leu Phe Arg	Arg Asn Asn Gly Thr Leu	Leu Val Gln Ser		
	2085	2090		2095
Leu His Gly Val Phe Lys	Val Lys Asn Thr Thr Thr	Leu Gln Gln His		
	2100	2105		2110
Leu Ile Asp Gly Arg Asp	Met Ile Ile Ile Arg Met	Pro Lys Asp Phe		
	2115	2120		2125
Pro Pro Phe Pro Gln Lys	Leu Lys Phe Arg Glu Pro	Gln Arg Glu Glu		
	2130	2135		2140
Arg Ile Cys Leu Val Thr	Thr Asn Phe Gln Thr Lys	Ser Met Ser Ser		
2145	2150	2155		2160
Met Val Ser Asp Thr Ser	Cys Thr Phe Pro Ser Ser	Asp Gly Ile Phe		
	2165	2170		2175
Trp Lys His Trp Ile Gln	Thr Lys Asp Gly Gln Cys	Gly Ser Pro Leu		
	2180	2185		2190
Val Ser Thr Arg Asp Gly	Phe Ile Val Gly Ile His	Ser Ala Ser Asn		
	2195	2200		2205
Phe Thr Asn Thr Asn Asn	Tyr Phe Thr Ser Val Pro	Lys Asn Phe Met		
	2210	2215		2220
Glu Leu Leu Thr Asn Gln	Glu Ala Gln Gln Trp Val	Ser Gly Trp Arg		
2225	2230	2235		2240

ES 2 592 856 T3

Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Ser
 2245 2250 2255
 Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met
 2260 2265 2270
 Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln Gly Glu Lys Arg Lys Trp Val Val Glu
 2275 2280 2285
 Ala Leu Ser Gly Asn Leu Arg Pro Val Ala Glu Cys Pro Ser Gln Leu
 2290 2295 2300
 Val Thr Lys His Val Val Lys Gly Lys Cys Pro Leu Phe Glu Leu Tyr
 2305 2310 2315 2320
 Leu Gln Leu Asn Pro Glu Lys Glu Ala Tyr Phe Lys Pro Met Met Gly
 2325 2330 2335
 Ala Tyr Lys Pro Ser Arg Leu Asn Arg Glu Ala Phe Leu Lys Asp Ile
 2340 2345 2350
 Leu Lys Tyr Ala Ser Glu Ile Glu Ile Gly Asn Val Asp Cys Asp Leu
 2355 2360 2365
 Leu Glu Leu Ala Ile Ser Met Leu Val Thr Lys Leu Lys Ala Leu Gly
 2370 2375 2380
 Phe Pro Thr Val Asn Tyr Ile Thr Asp Pro Glu Glu Ile Phe Ser Ala
 2385 2390 2395 2400
 Leu Asn Met Lys Ala Ala Met Gly Ala Leu Tyr Lys Gly Lys Lys Lys
 2405 2410 2415
 Glu Ala Leu Ser Glu Leu Thr Leu Asp Glu Gln Glu Ala Met Leu Lys
 2420 2425 2430
 Ala Ser Cys Leu Arg Leu Tyr Thr Gly Lys Leu Gly Ile Trp Asn Gly
 2435 2440 2445
 Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Pro Ile Glu Lys Val Glu Asn Asn Lys
 2450 2455 2460
 Thr Arg Thr Phe Thr Ala Ala Pro Ile Asp Thr Leu Leu Ala Gly Lys
 2465 2470 2475 2480
 Val Cys Val Asp Asp Phe Asn Asn Gln Phe Tyr Asp Leu Asn Ile Lys
 2485 2490 2495
 Ala Pro Trp Thr Val Gly Met Thr Lys Phe Tyr Gln Gly Trp Asn Glu
 2500 2505 2510
 Leu Met Glu Ala Leu Pro Ser Gly Trp Val Tyr Cys Asp Ala Asp Gly
 2515 2520 2525
 Ser Gln Phe Asp Ser Ser Leu Thr Pro Phe Leu Ile Asn Ala Val Leu
 2530 2535 2540
 Lys Val Arg Leu Ala Phe Met Glu Glu Trp Asp Ile Gly Glu Gln Met
 2545 2550 2555 2560
 Leu Arg Asn Leu Tyr Thr Glu Ile Val Tyr Thr Pro Ile Leu Thr Pro
 2565 2570 2575
 Asp Gly Thr Ile Ile Lys Lys His Lys Gly Asn Asn Ser Gly Gln Pro
 2580 2585 2590
 Ser Thr Val Val Asp Asn Thr Leu Met Val Ile Ile Ala Met Leu Tyr
 2595 2600 2605
 Thr Cys Glu Lys Cys Gly Ile Asn Lys Glu Glu Ile Val Tyr Tyr Val
 2610 2615 2620
 Asn Gly Asp Asp Leu Leu Ile Ala Ile His Pro Asp Lys Ala Glu Arg
 2625 2630 2635 2640
 Leu Ser Arg Phe Lys Glu Ser Phe Gly Glu Leu Gly Leu Lys Tyr Glu
 2645 2650 2655
 Phe Asp Cys Thr Thr Arg Asp Lys Thr Gln Leu Trp Phe Met Ser His
 2660 2665 2670
 Arg Ala Leu Glu Arg Asp Gly Met Tyr Ile Pro Lys Leu Glu Glu Glu
 2675 2680 2685
 Arg Ile Val Ser Ile Leu Glu Trp Asp Arg Ser Lys Glu Pro Ser His
 2690 2695 2700
 Arg Leu Glu Ala Ile Cys Ala Ser Met Ile Glu Ala Trp Gly Tyr Asp
 2705 2710 2715 2720
 Lys Leu Val Glu Glu Ile Arg Asn Phe Tyr Ala Trp Val Leu Glu Gln
 2725 2730 2735
 Ala Pro Tyr Ser Gln Leu Ala Glu Glu Gly Lys Ala Pro Tyr Leu Ala

			2740					2745					2750		
Glu	Thr	Ala	Leu	Lys	Phe	Leu	Tyr	Thr	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Asn	Ser
			2755					2760					2765		
Glu	Ile	Glu	Glu	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Ile	Pro	Thr
			2770					2775					2780		
Thr	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ala	Gly	Ala	Asp
			2785					2790				2795			2800
Ala	Gly	Lys	Lys	Lys	Asp	Gln	Lys	Asp	Asp	Lys	Val	Ala	Glu	Gln	Ala
					2805					2810					2815
Ser	Lys	Asp	Arg	Asp	Val	Asn	Ala	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Phe	Ser	Val
					2820				2825						2830
Pro	Arg	Ile	Asn	Ala	Met	Ala	Thr	Lys	Leu	Gln	Tyr	Pro	Arg	Met	Arg
					2835			2840							2845
Gly	Glu	Val	Val	Val	Asn	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Gly	Tyr	Lys	Pro	Gln
					2850			2855							2860
Gln	Ile	Asp	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	Ala	Thr	His	Glu	Gln	Phe	Ala	Ala
					2865										2880
Trp	His	Gln	Ala	Val	Met	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val	Asn	Glu	Glu	Gln	Met
					2885					2890					2895
Lys	Ile	Leu	Leu	Asn	Gly	Phe	Met	Val	Trp	Cys	Ile	Glu	Asn	Gly	Thr
					2900					2905					2910
Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Trp	Val	Met	Met	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln
					2915				2920						2925
Val	Ser	Tyr	Pro	Leu	Lys	Pro	Met	Val	Glu	Asn	Ala	Gln	Pro	Thr	Leu
					2930							2940			
Arg	Gln	Ile	Met	Thr	His	Phe	Ser	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ile	Glu
					2945							2955			2960
Met	Arg	Asn	Arg	Glu	Arg	Pro	Tyr	Met	Pro	Arg	Tyr	Gly	Leu	Gln	Arg
					2965					2970					2975
Asn	Ile	Thr	Asp	Met	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Phe	Asp	Phe	Tyr	Glu
					2980					2985					2990
Leu	Thr	Ser	Lys	Thr	Pro	Val	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	His	Met	Gln	Met
					2995					3000					3005
Lys	Ala	Ala	Ala	Val	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Phe	Gly	Leu	Asp
					3010										3020
Gly	Asn	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Arg	His	Thr	Ala	His
					3025										3040
Asp	Val	Asn	Arg	Asn	Met	His	Thr	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Gln		
					3045										3050

<210> 15

5 <211> 242

<212> PRT

10 <213> Potivirus

<400> 15

ES 2 592 856 T3

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

<210> 16

5 <211> 242

<212> PRT

10 <213> Potivirus

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> 216

20 <223> S219N

<400> 16

ES 2 592 856 T3

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

<210> 17

5 <211> 242

<212> PRT

10 <213> Potivirus

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> 56

20 <223> L56V

<221> VARIANTE

25 <222> 135

<223> S135G

30 <221> VARIANTE

<222> 219

35 <223> S219N

<400> 17

5

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

<210> 18

10 <211> 242

<212> PRT

<213> Potivirus

15

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> 17

<223> T17V

25

<221> VARIANTE

30 <222> 68

<223> N68D

35

<221> VARIANTE

<222> 77

5 <223> I77V

<221> VARIANTE

10 <222> 219

<223> S219N

15 <400> 18

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

20 <210> 19

<211> 242

<212> PRT

25 <213> Potivirus

30 <220>

<221> VARIANTE

<222> 44

35 <223> N44V

5 <221> VARIANTE

<222> 56

<223> L56V

10

<221> VARIANTE

<222> 135

15

<223> S135G

20 <221> VARIANTE

<222> 219

<223> S219N

25

<400> 19

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

30

<210> 20

<211> 242

35

<212> PRT

<213> Potivirus

5

<220>

<221> VARIANTE

10

<222> 56

<223> L56V

15

<221> VARIANTE

<222> 68

20

<223> N68D

<221> VARIANTE

25

<222> 135

<223> S135G

30

<221> VARIANTE

<222> 219

35

<223> S219N

40

<400> 20

ES 2 592 856 T3

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

<210> 21

5 <211> 242

<212> PRT

10 <213> Potivirus

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> 17

20 <223> T17S

<221> VARIANTE

25 <222> 56

<223> L56V

30 <221> VARIANTE

<222> 68

35 <223> N68D

<221> VARIANTE

5 <222> 77

<223> I77V

10 <221> VARIANTE

<222> 219

15 <223> S219N

<400> 21

20

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

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

<210> 22

25 <211> 242

<212> PRT

<213> Potivirus

30

<220>

<221> VARIANTE

5

<222> 17

<223> T17S

10 <221> VARIANTE

<222> 68

15

<223> N68D

<221> VARIANTE

20

<222> 77

<223> I77V

25

<221> VARIANTE

<222> 135

30

<223> S135G

<221> VARIANTE

35

<222> 219

<223> S219N

40

<400> 22

ES 2 592 856 T3

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

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

<210> 23

5 <211> 242

<212> PRT

10 <213> Potivirus

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> 17

20 <223> T17S

<221> VARIANTE

25 <222> 44

<223> N44V

30 <221> VARIANTE

<222> 56

<223> L56V

5

<221> VARIANTE

<222> 68

10

<223> N68D

<221> VARIANTE

15

<222> 77

<223> I77V

20

<221> VARIANTE

<222> 135

25

<223> S135G

<221> VARIANTE

30

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

<223> S219N

35

<400> 23

ES 2 592 856 T3

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

<210> 24

5 <211> 3023

<212> PRT

<213> Potivirus

10

<400> 24

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

15

Lys Lys Arg Val Cys Gly Glu Phe Lys Gln Thr Arg Phe Gly Arg Ala
 165 170 175
 Leu Phe Ile Asp Val Ala His Ala Lys Gly His Arg Arg Arg Ile Asp
 180 185 190
 Cys Arg Met His Arg Arg Glu Gln Arg Thr Met His Met Phe Met Arg
 195 200 205
 Lys Thr Thr Lys Thr Glu Val Arg Ser Lys His Leu Arg Lys Gly Asp
 210 215 220
 Ser Gly Ile Val Leu Leu Thr Gln Lys Ile Lys Gly His Leu Ser Gly
 225 230 235 240
 Val Arg Asp Glu Phe Phe Ile Val Arg Gly Thr Cys Asp Asp Ser Leu
 245 250 255
 Leu Glu Ala Arg Ala Arg Phe Ser Gln Ser Ile Thr Leu Arg Ala Thr
 260 265 270
 His Phe Ser Thr Gly Asp Ile Phe Trp Lys Gly Phe Asn Ala Ser Phe
 275 280 285
 Gln Glu Gln Lys Ala Ile Gly Leu Asp His Thr Cys Thr Ser Asp Leu
 290 295 300
 Pro Val Glu Ala Cys Gly His Val Ala Ala Leu Met Cys Gln Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Pro Cys Gly Lys Ile Thr Cys Lys Arg Cys Ile Ala Asn Leu Ser
 325 330 335
 Asn Leu Asp Phe Asp Thr Phe Ser Glu Leu Gln Gly Asp Arg Ala Met
 340 345 350
 Arg Ile Leu Asp Val Met Arg Ala Arg Phe Pro Ser Phe Thr His Thr
 355 360 365
 Ile Arg Phe Leu His Asp Leu Phe Thr Gln Arg Arg Val Thr Asn Pro
 370 375 380
 Asn Thr Ala Ala Phe Arg Glu Ile Leu Arg Leu Ile Gly Asp Arg Asn
 385 390 395 400
 Glu Ala Pro Phe Ala His Val Asn Arg Leu Asn Glu Ile Leu Leu Leu
 405 410 415
 Gly Ser Lys Ala Asn Pro Asp Ser Leu Ala Lys Ala Ser Asp Ser Leu
 420 425 430
 Leu Glu Leu Ala Arg Tyr Leu Asn Asn Arg Thr Glu Asn Ile Arg Asn
 435 440 445
 Gly Ser Leu Lys His Phe Arg Asn Lys Ile Ser Ser Lys Ala His Ser
 450 455 460
 Asn Leu Ala Leu Ser Cys Asp Asn Gln Leu Asp Gln Asn Gly Asn Phe
 465 470 475 480
 Leu Trp Gly Leu Ala Gly Ile Ala Ala Lys Arg Phe Leu Asn Asn Tyr
 485 490 495
 Phe Glu Thr Ile Asp Pro Glu Gln Gly Tyr Asp Lys Tyr Val Ile Arg
 500 505 510
 Lys Asn Pro Asn Gly Glu Arg Lys Leu Ala Ile Gly Asn Phe Ile Ile
 515 520 525
 Ser Thr Asn Leu Glu Lys Leu Arg Asp Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ile
 530 535 540
 Ala Arg Val Gly Ile Thr Glu Glu Cys Val Ser Arg Lys Asp Gly Asn
 545 550 555 560
 Tyr Arg Tyr Pro Cys Cys Val Thr Leu Glu Asp Gly Ser Pro Met
 565 570 575
 Tyr Ser Glu Leu Lys Met Pro Thr Lys Asn His Leu Val Ile Gly Asn
 580 585 590
 Ser Gly Asp Pro Lys Tyr Leu Asp Leu Pro Gly Glu Ile Ser Asn Leu
 595 600 605
 Met Tyr Ile Ala Lys Glu Gly Tyr Cys Tyr Ile Asn Ile Phe Leu Ala
 610 615 620
 Met Leu Val Asn Val Asp Glu Ala Asn Ala Lys Asp Phe Thr Lys Arg
 625 630 635 640
 Val Arg Asp Glu Ser Val Gln Lys Leu Gly Lys Trp Pro Ser Leu Ile
 645 650 655
 Asp Val Ala Thr Glu Cys Ala Leu Leu Ser Thr Tyr Tyr Pro Ala Ala

ES 2 592 856 T3

Trp Ser Asn Gln Ile Ala Asn Asn Arg Val Val Pro His Tyr Arg Thr
 1170 1175 1180
 Glu Gly Tyr Phe Met Gln Phe Thr Arg Asn Thr Ala Ser Ala Val Ser
 1185 1190 1195 1200
 His Gln Ile Ala His Asn Glu His Lys Asp Ile Ile Leu Met Gly Ala
 1205 1210 1215
 Val Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gly Leu Pro Thr Asn Leu Cys Lys Phe
 1220 1225 1230
 Gly Gly Val Leu Leu Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu Ala Glu Asn Val
 1235 1240 1245
 Thr Lys Gln Met Arg Gly Ser Pro Phe Phe Ala Ser Pro Thr Leu Arg
 1250 1255 1260
 Met Arg Asn Leu Ser Thr Phe Gly Ser Ser Pro Ile Thr Val Met Thr
 1265 1270 1275 1280
 Thr Gly Phe Ala Leu His Phe Phe Ala Asn Asn Val Lys Glu Phe Asp
 1285 1290 1295
 Arg Tyr Gln Phe Ile Ile Phe Asp Glu Phe His Val Leu Asp Ser Asn
 1300 1305 1310
 Ala Ile Ala Phe Arg Asn Leu Cys His Glu Tyr Ser Tyr Asn Gly Lys
 1315 1320 1325
 Ile Ile Lys Val Ser Ala Thr Pro Pro Gly Arg Glu Cys Asp Leu Thr
 1330 1335 1340
 Thr Gln Tyr Pro Val Glu Leu Leu Ile Glu Glu Gln Leu Ser Leu Arg
 1345 1350 1355 1360
 Asp Phe Val Asp Ala Gln Gly Thr Asp Ala His Ala Asp Val Val Lys
 1365 1370 1375
 Lys Gly Asp Asn Ile Leu Val Tyr Val Ala Ser Tyr Asn Glu Val Asp
 1380 1385 1390
 Gln Leu Ser Lys Met Leu Asn Glu Arg Gly Phe Leu Val Thr Lys Val
 1395 1400 1405
 Asp Gly Arg Thr Met Lys Leu Gly Gly Val Glu Ile Ile Thr Lys Gly
 1410 1415 1420
 Ser Ser Ile Lys Lys His Phe Ile Val Ala Thr Asn Ile Ile Glu Asn
 1425 1430 1435 1440
 Gly Val Thr Leu Asp Val Asp Val Val Asp Phe Gly Leu Lys Val
 1445 1450 1455
 Val Pro Asn Leu Asp Ser Asp Asn Arg Leu Val Ser Tyr Cys Lys Ile
 1460 1465 1470
 Pro Ile Ser Leu Gly Glu Arg Ile Gln Arg Phe Gly Arg Val Gly Arg
 1475 1480 1485
 Asn Lys Pro Gly Val Ala Leu Arg Ile Gly Glu Thr Ile Lys Gly Leu
 1490 1495 1500
 Val Glu Ile Pro Ser Met Ile Ala Thr Glu Ala Ala Phe Leu Cys Phe
 1505 1510 1515 1520
 Val Tyr Gly Leu Pro Val Thr Thr Gln Asn Val Ser Thr Ser Ile Leu
 1525 1530 1535
 Ser Gln Val Ser Val Arg Gln Ala Arg Val Met Cys Gln Phe Glu Leu
 1540 1545 1550
 Pro Ile Phe Tyr Thr Ala His Leu Val Arg Tyr Asp Gly Ala Met His
 1555 1560 1565
 Pro Ala Ile His Asn Ala Leu Lys Arg Phe Lys Leu Arg Asp Ser Glu
 1570 1575 1580
 Ile Asn Leu Asn Thr Leu Ala Ile Pro Thr Ser Ser Ser Lys Thr Trp
 1585 1590 1595 1600
 Tyr Thr Gly Lys Cys Tyr Lys Gln Leu Val Gly Arg Leu Asp Ile Pro
 1605 1610 1615
 Asp Glu Ile Lys Ile Pro Phe Tyr Thr Lys Glu Val Pro Glu Lys Val
 1620 1625 1630
 Pro Glu Gln Ile Trp Asp Val Met Val Lys Phe Ser Ser Asp Ala Gly
 1635 1640 1645
 Phe Gly Arg Met Thr Ser Ala Ala Ala Cys Lys Val Ala Tyr Thr Leu
 1650 1655 1660
 Gln Thr Asp Ile His Ser Ile Gln Arg Thr Val Gln Ile Ile Asp Arg

ES 2 592 856 T3

Ser Asn Tyr Phe Val Glu Phe Pro Glu Lys Phe Val Ala Thr Tyr Leu
 2180 2185 2190
 Asp Ala Ala Asp Gly Trp Cys Lys Asn Trp Lys Phe Asn Ala Asp Lys
 2195 2200 2205
 Ile Ser Trp Gly Ser Phe Thr Leu Val Glu Asp Ala Pro Glu Asp Asp
 2210 2215 2220
 Phe Met Ala Lys Lys Thr Val Ala Ala Ile Met Asp Asp Leu Val Arg
 2225 2230 2235 2240
 Thr Gln Gly Glu Lys Arg Lys Trp Met Leu Glu Ala Ala His Thr Asn
 2245 2250 2255
 Ile Gln Pro Val Ala His Leu Gln Ser Gln Leu Val Thr Lys His Ile
 2260 2265 2270
 Val Lys Gly Arg Cys Lys Met Phe Ala Leu Tyr Leu Gln Glu Asn Ala
 2275 2280 2285
 Asp Ala Arg Asp Phe Phe Lys Ser Phe Met Gly Ala Tyr Gly Pro Ser
 2290 2295 2300
 His Leu Asn Lys Glu Ala Tyr Ile Lys Asp Ile Met Lys Tyr Ser Lys
 2305 2310 2315 2320
 Gln Ile Val Val Gly Ser Val Asp Cys Asp Thr Phe Glu Ser Ser Leu
 2325 2330 2335
 Lys Val Leu Ser Arg Lys Met Lys Glu Trp Gly Phe Glu Asn Leu Glu
 2340 2345 2350
 Tyr Val Thr Asp Glu Gln Thr Ile Lys Asn Ala Leu Asn Met Asp Ala
 2355 2360 2365
 Ala Val Gly Ala Leu Tyr Ser Gly Lys Lys Lys Gln Tyr Phe Glu Asp
 2370 2375 2380
 Leu Ser Asp Asp Ala Val Ala Asn Leu Val Gln Lys Ser Cys Leu Arg
 2385 2390 2395 2400
 Leu Phe Lys Asn Lys Leu Gly Val Trp Asn Gly Ser Leu Lys Ala Glu
 2405 2410 2415
 Leu Arg Pro Phe Glu Lys Leu Ile Glu Asn Lys Thr Arg Thr Phe Thr
 2420 2425 2430
 Ala Ala Pro Ile Glu Thr Leu Leu Gly Gly Lys Val Cys Val Asp Asp
 2435 2440 2445
 Phe Asn Asn His Phe Tyr Ser Lys His Ile Gln Cys Pro Trp Ser Val
 2450 2455 2460
 Gly Met Thr Lys Phe Tyr Gly Gly Trp Asn Glu Leu Leu Gly Lys Leu
 2465 2470 2475 2480
 Pro Asp Gly Trp Val Tyr Cys Asp Ala Asp Gly Ser Gln Phe Asp Ser
 2485 2490 2495
 Ser Leu Ser Pro Tyr Leu Ile Asn Ala Val Leu Arg Leu Arg Leu Ser
 2500 2505 2510
 Ser Met Glu Glu Trp Asp Val Gly Gln Lys Met Leu Gln Asn Leu Tyr
 2515 2520 2525
 Thr Glu Ile Val Tyr Thr Pro Ile Ser Thr Pro Asp Gly Thr Ile Val
 2530 2535 2540
 Lys Lys Phe Lys Gly Asn Asn Ser Gly Gln Pro Ser Thr Val Val Asp
 2545 2550 2555 2560
 Asn Thr Leu Met Val Val Leu Ala Met Tyr Tyr Ala Leu Ser Lys Leu
 2565 2570 2575
 Gly Val Asp Ile Asn Ser Gln Glu Asp Val Cys Lys Phe Phe Ala Asn
 2580 2585 2590
 Gly Asp Asp Leu Ile Ile Ala Ile Ser Pro Glu Leu Glu His Val Leu
 2595 2600 2605
 Asp Gly Phe Gln Gln His Phe Ser Asp Leu Gly Leu Asn Tyr Asp Phe
 2610 2615 2620
 Ser Ser Arg Thr Arg Asp Lys Lys Glu Leu Trp Phe Met Ser His Arg
 2625 2630 2635 2640
 Ala Leu Ser Lys Asp Gly Ile Leu Ile Pro Lys Leu Glu Pro Glu Arg
 2645 2650 2655
 Ile Val Ser Ile Leu Glu Trp Asp Arg Ser Ala Glu Pro His His Arg
 2660 2665 2670
 Leu Glu Ala Ile Cys Ala Ser Met Ile Glu Ala Trp Gly Tyr Thr Asp

ES 2 592 856 T3

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

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

<210> 26

5 <211> 277

<212> PRT

10 <213> Rattus norvegicus

<400> 26

ES 2 592 856 T3

```

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

145      150      155      160
Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
      165      170      175
Gly Thr Asp Asp Asp Met Ala Cys Gln Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp
      180      185      190
Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
      195      200      205
Ser Arg Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
      210      215      220
Leu Tyr Ala His Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
      225      230      235
Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Leu Asp Ala Thr Phe
      245      250      255
His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
      260      265      270
Leu Tyr Phe Tyr His
      275

```

<210> 27

5 <211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<221> VARIANTE

20 <222> 2, 3, 5

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25

<400> 27

ES 2 592 856 T3

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Gly
1 5

- <210> 28
- 5 <211> 7
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 15 <223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco
- <221> VARIANTE
- 20 <222> 2, 3, 5
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 25
- <400> 28

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Ser
1 5

- 30 <210> 29
- <211> 7
- 35 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
- <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco
- 45
- <400> 29

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

- 50 <210> 30
- <211> 7
- 55 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 592 856 T3

<220>

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

<400> 30

10

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

<210> 31

15 <211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 31

30

Glu Asn Ile Tyr Thr Gln Gly
1 5

<210> 32

35 <211> 7

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 32

50

Glu Asn Ile Tyr Thr Gln Ser
1 5

<210> 33

55 <211> 7

<212> PRT

ES 2 592 856 T3

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

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

10

<400> 33

Glu Asn Ile Tyr Leu Gln Gly
1 5

15 <210> 34

<211> 7

<212> PRT

20

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

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

30

<400> 34

Glu Asn Ile Tyr Leu Gln Ser
1 5

35 <210> 35

<211> 7

<212> PRT

40

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

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

50

<400> 35

Glu Asn Val Tyr Phe Gln Gly
1 5

55 <210> 36

<211> 7

ES 2 592 856 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

10 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 36

15

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Ser
1 5

<210> 37

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

30 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 37

35

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Gly
1 5

<210> 38

40 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

50 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de grabado del tabaco

<400> 38

55

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Ser
1 5

<210> 39

<211> 7
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus
de moteado de las venas del tabaco
15

<221> VARIANTE
20 <222> 1, 2
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25 <400> 39

Xaa Xaa Val Arg Phe Gln Gly
1 5

30 <210> 40
<211> 7
<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del virus
de moteado de la vena del tabaco
45

<221> VARIANTE
50 <222> 1, 2
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

55 <400> 40

Xaa Xaa Val Arg Phe Gln Ser
1 5

ES 2 592 856 T3

<210> 41

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

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

15

<400> 41

Glu Thr Val Arg Phe Gln Gly
1 5

20

<210> 42

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

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

35

<400> 42

Glu Thr Val Arg Phe Gln Ser
1 5

40

<210> 43

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

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

55

<400> 43

ES 2 592 856 T3

Asn Asn Val Arg Phe Gln Gly
1 5

- <210> 44
5 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
10
<220>
15 <223> Sitio de escisión de proteasa del virus de moteado de las venas del tabaco
20 <400> 44

Asn Asn Val Arg Phe Gln Ser
1 5

- <210> 45
25 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
30
<220>
35 <223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa del
rinovirus humano 3C
40 <221> VARIANTE
<222> 1
45 <223> Xaa puede ser aminoácido, con D o E preferidos
50 <221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa puede ser G, A, V, L, I, M, S o T
55
<400> 45

ES 2 592 856 T3

Xaa Xaa Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 46

5 <211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

20 <400> 46

Glu Ala Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 47

25 <211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

40 <400> 47

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 48

45 <211> 7

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Sitio de escisión de proteasa del rinovirus humano 3C

ES 2 592 856 T3

<400> 48

Glu Leu Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

5

<210> 49

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

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

20

<400> 49

Asp Ala Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

25

<210> 50

<211> 7

30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

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

40

<400> 50

Asp Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

45

<210> 51

<211> 7

50

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

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

5 <400> 51

Asp Leu Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 52

10

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

20

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

25

<221> VARIANTE

<222> 1, 2, 3, 4

30

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

35 <400> 52

Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr
1 5

<210> 53

40

<211> 6

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50

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

55

<221> VARIANTE

<222> 1, 2, 3, 4

60

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

ES 2 592 856 T3

5 <400> 53
Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr
1 5

<210> 54
10 <211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
15
<220>
20 <223> Sitio de escisión de proteasa de subtilisina

<400> 54
25 His Tyr
1

<210> 55
30 <211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
35
<220>
40 <223> Sitio de escisión de proteasa de subtilisina

<400> 55
45 Tyr His
1

<210> 56
50 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
55
<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de subtilisina

5
<400> 56

Pro Gly Ala Ala His Tyr
1 5

10 <210> 57

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

20 <220>

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

25 <221> VARIANTE

<222> 2

30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido con E preferido

<221> VARIANTE

35 <222> 3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40 <221> VARIANTE

<222> 5

45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido con G o S preferidos

50 <400> 57

Asp Xaa Xaa Asp Xaa
1 5

55 <210> 58

<211> 5

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

10 <400> 58

Asp Glu Val Asp Gly
1 5

15 <210> 59
<211> 5
<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

30 <400> 59

Asp Glu Val Asp Ser
1 5

35 <210> 60
<211> 5
<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

50 <400> 60

Asp Glu Pro Asp Gly
1 5

55 <210> 61
<211> 5
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

10

<400> 61

Asp Glu Pro Asp Ser
1 5

15

<210> 62

<211> 5

20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

30

<400> 62

Asp Glu Leu Asp Gly
1 5

35

<210> 63

<211> 5

40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Sitio de escisión de proteasa de caspasa 3

50

<400> 63

Asp Glu Leu Asp Ser
1 5

55

<210> 64

<211> 5

ES 2 592 856 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

10 <223> Secuencia de consenso del sitio de escisión de proteasa de
enteroquinasa

15

<400> 64

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

20 <210> 65

<211> 753

<212> ADN

25

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

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

35

<400> 65

```

atgggcgaat ctctgttcaa gggccgcggt gattataacc cgatatcttc tactatattgt 60
catctgacta acgaaagcga cggccacaag acttctctgt acgggatcgg tttcgggtccg 120
ttcatcatta ccaacaagca tctgttccgc cgtaacaacg gtaccctgct ggttcaatct 180
ctgcacggcg tcttcaaggt aaaaaatacc actacgctgc agcagcacct gattgacggc 240
cgtgacatga tcatcatccg catgccgaaa gattttccgc cgttcccgca aaaactgaag 300
ttcogtgaac cgcaacgcga agaacgtatt tgcctgggta ccaccaactt tcagaccaa 360
agcatgtctt ctatggtttc cgatacctct tgcaccttcc caagctctga cggtatatttc 420
tggaaacatt ggatccagac caaagatggg cagtgcggct ctccgctggt gtctacgcgt 480
gacggtttca tcgttggtat ccattctgct tctaacttca ctaacactaa caactacttt 540
acttccggtc cgaaaaactt catggagctg ctgactaacc aagaggccca gcagtgggtg 600
tccggttggc gcctgaacgc agattctgta ctgtggggtg gtcataaggt attcatgaac 660
aaaccggagg agccgttcca gccggtcaaa gaggcgacc agctgatgaa cgaactgggt 720
tactctcagg gtcaccacca tcaccacat taa 753

```

40 <210> 66

<211> 250

<212> PRT

45

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

ES 2 592 856 T3

<223> Proteasa TEV (S219N) con marcador de afinidad de polihistidina

de amino terminal

5

<400> 66

```

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

```

245

250

10

<210> 67

<211> 753

15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

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

25

<400> 67

ES 2 592 856 T3

```
atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
ccgatatctt ctactatattg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacgggatcg gtttogggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagccctgg tggttcaatc tctgcaoggc gtcttcaagg taaaaaatac cactacgctg 240
cagcagcacc tgattgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcggtg acggtatattt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggtg tccattctgc ttotaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttcogtt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgagg gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtggggg 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacgggag gagcogttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
```

<210> 68

5 <211> 250

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

20 <400> 68

ES 2 592 856 T3

```

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

```

<210> 69

5 <211> 753

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV con codón optimizado

20 <400> 69

ES 2 592 856 T3

```
atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca agggtcgagc tgattataac 60
ccgatatctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcggtcc gtccatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagcctgc tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgag aagaacgtat ttgcctggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgataacctc ttgcacctc 420
ccaagctctg acggtatctt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgag tgacggtttc atcgttggta tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgctgaacg cagattctgt actgtggggg 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
```

<210> 70

5 <211> 250

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Proteasa TEV (T17S, N68D, I77V, S219N) con marcador de
afinidad de polihistidina amino terminal

20 <400> 70

ES 2 592 856 T3

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

<210> 71

5 <211> 753

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV con codón optimizado

<400> 71

20

ES 2 592 856 T3

```

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggccgcg tgattataac 60
ccgatatctt ctactatctt tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcgggtc gttcatcatt accgtgaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagcctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaaaatac cactacgctg 240
cagcagcacc tgattgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcgtg acggtatctt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacgggttc atcgttggtt tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgctgaacg cagattctgt actgtggggt 660
ggtcataag tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

```

<210> 72

5 <211> 250

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Proteasa TEV (N44V, L56V, S135G, S219N) con marcador de
afinidad de polihistidina amino terminal

20

<400> 72

```

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

```

ES 2 592 856 T3

```

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

```

<210> 73

5 <211> 753

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV con codón optimizado

```

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggtccgcg tgattataac 60
ccgatatctt ctactatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcgggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagcctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tgattgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctgggt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcgggtg acggtatfff ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggttc atcgttggtg tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggt gtccgggttg cgcctgaacg cagattctgt actgtggggg 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753

```

20

<210> 74

<211> 250

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Proteasa TEV (L56V, N68D, S135G, S219N) con marcador de

35 afinidad de polihistidina amino terminal

<400> 74

40

ES 2 592 856 T3

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

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

<210> 75

5 <211> 753

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV con codón optimizado

20 <400> 75

ES 2 592 856 T3

```
atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca aggggccgcg tgattataac 60
ccgatatctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcgggtcc gtccatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagcctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagctctg acgggtatctt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggtt tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtggggt gtccggttgg cgctgaacg cagattctgt actgtgggggt 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
```

<210> 76

5 <211> 250

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Proteasa TEV (T17S, L56V, N68D, I77V, S219N) con marcador de
afinidad de polihistidina de amino terminal

20 <400> 76

ES 2 592 856 T3

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

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

<210> 77

5 <211> 753

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV con codón optimizado

20 <400> 77

```

atgggtcacc accatcacca ccatggogaa tctctgttca aggggccgcg tgattataac 60
ccgatattctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcgggtcc gttcatcatt accaacaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtagcctgc tggttcaatc tctgcaoggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tggtagcagg cctgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgcg aagaacgtat ttgcctggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcgggtg acgggtatctt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgttggtg tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggg gtccggttgg cgctgaacg cagattctgt actgtggggg 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
  
```

ES 2 592 856 T3

<210> 78

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

15 <223> Proteasa TEV (T17S, N68D, I77V, S135G, S219N) con marcador de
afinidad de polihistidina amino terminal

20 <400> 78

```

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

```

<210> 79

25 <211> 753

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

ES 2 592 856 T3

<220>

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

5

<400> 79

```

atgggcgaat ctctgttcaa ggtccgcgt gattataacc cgatatcttc ttctatttgt 60
catctgacta acgaaagcga cggccacacg acttctctgt acggtatcgg tttcgggtccg 120
ttcatcatta ccgtgaagca tctgttcogc cgtaacaacg gtaccctggt ggttcaatct 180
ctgcacggcg tcttcaaggt aaaagacacc actacgctgc agcagcacct ggtcgcacgc 240
cgtgacatga tcatcatccg catgccgaaa gattttccgc cgttcccgcga aaaactgaag 300
tttctgtgaac cgcaacgcga agaacgtatt tgcctggta ccaccaactt tcagaccaa 360
agcatgtctt ctatggtttc cgatacctct tgcaccttcc caagcgggta cggtatatttc 420
tggaaacatt ggatccagac caaagatggt cagtgcggct ctccgctggt gtctacgcgt 480
gacggtttca tcgttgggat ccattctgct tctaacttca ctaaacactaa caactacttt 540
acttccggtc cgaaaaactt catggagctg ctgactaacc aagaggcca gcagtgggtg 600
tccggttggc gcctgaacgc agattctgta ctgtgggtg gtcataaggt attcatgaac 660
aaaccggagg agccgttcca gccggtcaa gaggcgacc agctgatgaa cgaactgggt 720
tactctcagg gtcaccacca tcaccacat taa 753
    
```

10

<210> 80

<211> 250

15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

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

25

S219N) con marcador de afinidad de polihistidina de

carboxilo terminal

30

<400> 80

```

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

ES 2 592 856 T3

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

<210> 81

5 <211> 753

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV con codón optimizado

20 <400> 81

```

atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca agggtcocgog tgattataac 60
ccgatatctt cttctatttg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatcg gtttcgggtcc gttcatcatt accogtgaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacgog aagaacgtat ttgcctgggt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgataccte ttgcaccttc 420
ccaagcggtg acggtatttt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgog tgacggtttc atcgttggtt tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtggyt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtggggt 660
ggtcataagg tattcatggt gaaaccggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
    
```

<210> 82

ES 2 592 856 T3

<211> 250

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

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

S219V) con marcador de afinidad de polihistidina amino terminal

15

<400> 82

```

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

```

20

<210> 83

<211> 753

25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

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

35

ES 2 592 856 T3

<400> 83

```
atgggtcacc accatcacca ccatggcgaa tctctgttca agggtcocgq tgattataac 60
ccgatatott cttctatrtg tcatctgact aacgaaagcg acggccacac gacttctctg 120
tacggtatocg gtttcoggtcc gttcatcatt accgtgaagc atctgttccg ccgtaacaac 180
ggtaccctgg tggttcaatc tctgcacggc gtcttcaagg taaaagacac cactacgctg 240
cagcagcacc tggtcgacgg ccgtgacatg atcatcatcc gcatgccgaa agattttccg 300
ccgttcccgc aaaaactgaa gtttcgtgaa ccgcaacggc aagaacgtat ttgcctggtt 360
accaccaact ttcagaccaa aagcatgtct tctatggttt ccgatacctc ttgcaccttc 420
ccaagcggtg acggtatrtt ctggaaacat tggatccaga ccaaagatgg tcagtgcggc 480
tctccgctgg tgtctacgcg tgacggtttc atcgtttgga tccattctgc ttctaacttc 540
actaacacta acaactactt tacttccggt ccgaaaaact tcatggagct gctgactaac 600
caagaggccc agcagtgggt gtccggttgg cgcctgaacg cagattctgt actgtggggt 660
ggtcataagg tattcatgaa caaacggag gagccgttcc agccgggtcaa agaggcgacc 720
cagctgatga acgaactggt ttactctcag taa 753
```

5

<210> 84

<211> 250

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

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

20

S219N) con marcador de afinidad de polihistidina amino terminal

25

<400> 84

ES 2 592 856 T3

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

<210> 85

5 <211> 750

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto de TEV nativo

20 <400> 85

ES 2 592 856 T3

```
atgcatcacc atcaccacca tggagaaagc ttgtttaagg gaccacgtga ttacaaccocg 60
atatcgagca ccatttgtca ttgacgaat gaatctgatg ggcacacaac atcgttgtat 120
ggtattggat ttggtccctt catcattaca aacaagcact tgtttcgccg taataatgga 180
acactgttgg tccaatcact acatgggtga ttcaagggtca agaacaccac gactttgcaa 240
caacacctca ttgatgggag ggacatgata attattcgca tgcctaagga tttcccacca 300
tttcctcaaa agctgaaatt tagagagcca caaaggggaag agcgcacatctg tcttgtgaca 360
accaacttcc aaactaagag catgtctagc atgggtgtcag aactagttg cacattccct 420
tcactgatg gcatattctg gaagcattgg atccaaacca aggatgggca gtgtggcagt 480
ccattagtat caactagaga tgggttcatt gttggtatac actcagcatc gaatttcacc 540
aacacaaaca attatttcac aagcgtgccg aaaaacttca tgggaattgtt gacaaatcag 600
gaggcgcagc agtgggttag tggttggcga ttaaattgctg actcagtatt gtgggggggc 660
cataaagttt tcatgaacaa acctgaagag ccttttcagc cagttaagga agcgactcaa 720
```

ctcatgaatg aattggtgta ctcgcaataa 750

<210> 86

5 <211> 249

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Proteasa TEV (S219N) con marcador de afinidad de polihistidina
de amino terminal

20 <400> 86

ES 2 592 856 T3

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

<210> 87

5 <211> 3984

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto que codifica BoNT/A-TEV

<400> 87

20

```
atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggTcaaAtg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcaCGaacc cGgaagaagg agatttaaAc 180
ccaccgctg aggctaaaca ggtcccggTg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggT gttaccaaac tGttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatgTt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgTt ttggggTggt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccGag cgcggatatt 480
```

atccaattcg aatgtaaate ttttgggcat gaagtctcga atctgacgcg gaatggctat 540
 ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
 gaagttgata cgaaccctct ttttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccc agcgggtgacc 660
 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccggaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgccttt 780
 gaagaactgc gcacgtttgg cggtcgatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaa 840
 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaa 960
 tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggctc 1080
 ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtcgcggtta ttatcaccag caaaaccaaa 1320
 tccttggggt gtgggtggcg aaacctgtac ttccagggcg gtggcgggtg tgataagggc 1380
 tataacaagg ccttaaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
 ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
 aacatcgaag cagcgggaaga gaatattagc ctggatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
 tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
 ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
 gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
 attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
 ttctcaagcg attatgtaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
 tgggtggaac aactggata tgactttacg gatgaaactt ctgaaagtctc gaccaccgac 1920
 aaaattgccc atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcaactgaa cattggtaac 1980
 atgctgtata aagatgattt tgtggcgccc ctgatctttt caggcgtgtg tatcctgctg 2040
 gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgctgctggg gtcctatctc 2100
 gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaaacg taacgaaaa 2160
 tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaaagtaa caccagatt 2220
 gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaaagct 2280
 attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
 atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
 aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
 aaacgtctgg aagacttctg tgcaagcctt aaagatgcc tttctgaagta tatttacgat 2520
 aatcgcgaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
 agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
 tttacggaat acatcaaaaa catcatcaac actagatttc tgaacttgcg ttacgagagt 2700
 aaccatctga ttgatctgag ccgttacgca tctaaaatca acatcggtc gaaggtgaa 2760
 ttcgatccta tcgacaaaaa ccagattcaa ttgttcaact tagaatcgtc aaagattgaa 2820
 gttatcttaa aaaatgcat tgtatataat tcaatgtacg aaaatttctc tacgagcttt 2880
 tggattcgtg ttccgaaata tttcaacagt atctctttaa acaacgagta tactatcatc 2940
 aattgtatgg agaataacag cgggtggaaa gtgagcctta actatggtga aatcatctgg 3000
 actctgcagg acactcaaga aattaaacaa cgcgtgggtg ttaaatactc acagatgatt 3060
 aacatctcgg attatattaa tcgctggatt tttgtgacaa ttactaaca cgggctgaa 3120
 aacagcaaaa tttacattaa cggctgcctg atcgatcaga aaccaatcag taatctcgtg 3180
 aacattcacg catcgaataa tatcatgttc aaactggatg gttgtcgcga cacgcaccgt 3240
 tacatttggg tcaaatactt caatttattc gacaaagaac tcaacgaaa ggagattaag 3300
 gatctttatg acaatcagtc taattcgggt attctgaaag acttttgggg tgattacctt 3360
 cagtacgata aaccgtatta tatgttaaac ttatatgatc cgaataaata cgttgacgtc 3420
 aacaacgttg gcattcgtgg ctatatgtat ctgaaagggc cgcgtggcag cgtgatgacc 3480
 actaacattt acttaaacct ctcctctat cgcggtacta aatttattat caagaaat 3540
 gctctggca acaaggacaa tatcgtacgc aataacgatc gcgtctacat taacgtggtg 3600
 gtgaagaata aagaatatcg tctggcgacc aatgctagtc aggcggcgt ggagaaaatt 3660
 ctgtctgcac ttgaaatccc ggatgtgggt aatttatccc aggtggtgt gatgaaaagt 3720
 aaaaatgacc aaggatcac caataatgc aaaatgaatc tgcaagataa caacggcaac 3780
 gacattggtt ttatcggctt ccaccaattc aataatatcg cgaactggt ggcctcaaat 3840
 tggtaaaccc gtcagattga gcgcagctcc cgcactttag gctgtagctg ggagttcatt 3900
 ccggtgatg acggttggg agaacgccc acaagcttgc ggcgcactc 3960
 gagcaccacc accaccacca ctga 3984

<210> 88

5 <211> 1327

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

- 5 <220>
<223> BoNT/A-TEV

- 10 <400> 88

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1 5 10 15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20 25 30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35 40 45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50 55 60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195 200 205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225 230 235 240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245 250 255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260 265 270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275 280 285
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290 295 300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325 330 335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340 345 350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405 410 415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Gly Gly Gly Glu Asn
435 440 445
Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Lys Ala

450						455					460				
Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe	Ser
465					470					475					480
Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu	Ile
				485					490						495
Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu	Asp
				500					505					510	
Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro	Glu
		515						520				525			
Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu	Glu
		530				535						540			
Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu	Leu
545				550						555					560
Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu	His
				565					570						575
Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu
				580					585					590	
Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys
				595			600					605			
Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Gln
				610			615					620			
Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr	Asp
625				630						635					640
Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu
				645					650						655
Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	Ile
				660					665					670	
Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile
				675				680						685	
Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys	Val
				690			695					700			
Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Lys
705				710						715					720
Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys	Val
				725					730						735
Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	Glu
				740					745					750	
Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Gln
				755			760							765	
Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp	Leu
				770			775					780			
Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	Asn
785				790						795					800
Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile
				805					810						815
Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp
				820					825					830	
Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln
				835			840							845	
Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile
				850			855					860			
Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr
865				870						875					880
Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu
				885					890						895
Arg	Tyr	Glu	Ser	Asn	His	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser	Lys
				900					905					910	
Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn	Gln
				915					920					925	
Ile	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Lys
				930			935					940			
Asn	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser	Phe
945					950					955					960

Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn Glu
 965 970 975
 Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser
 980 985 990
 Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu Ile
 995 1000 1005
 Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser Asp
 1010 1015 1020
 Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Asn
 1025 1030 1035 1040
 Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile
 1045 1050 1055
 Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu
 1060 1065 1070
 Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn
 1075 1080 1085
 Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp
 1090 1095 1100
 Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu
 1105 1110 1115 1120
 Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys
 1125 1130 1135
 Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys
 1140 1145 1150
 Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser
 1155 1160 1165
 Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn
 1170 1175 1180
 Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val
 1185 1190 1195 1200
 Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly
 1205 1210 1215
 Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu
 1220 1225 1230
 Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn
 1235 1240 1245
 Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe
 1250 1255 1260
 Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn
 1265 1270 1275 1280
 Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser
 1285 1290 1295
 Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu Lys
 1300 1305 1310
 Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 1315 1320 1325

<210> 89

5 <211> 1044

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia intercalada que contiene sitios transcripcionales y
 traduccionales.

20 <400> 89

ES 2 592 856 T3

aagcttgtagg cctcaaattg gtacaaccgt cagattgagc gcagctcccg cacttttaggc 60
 ttagctggg agttcattcc ggtagatgac ggtaggggag aacgcccatt gcaccatcat 120
 caccatcact gagcggccgc ataatgctta agtcgaacag attgatatgt agctataagt 180
 aatcgtattg tacacggccg cataatcgaa attaatacga ctactatag gggattgtg 240
 agcggataac aattccccat cttagtatat tagttaagta taagaaggag atataccatg 300

ggcgaatctc tgttcaaggg tccgcgtgat tataaccgga tatcttcttc tatttgatcat 360
 ctgactaacg aaagcgacgg ccacacgact tctctgtaag gtatcggttt cggtcctgtc 420
 atcattacca acaagcatct gttccgccgt aacaacggta ccctgctggt tcaatctctg 480
 cacggcgtct tcaaggtaaa agacaccact acgctgcagc agcacctggt cgacggccgt 540
 gacatgatca tcatccgcat gccgaaagat tttccgccgt tcccgcaaaa actgaagttt 600
 cgtgaaccgc aacgcgaaga acgtatttgc ctggttacca ccaactttca gaccaaaagc 660
 atgtcttcta tggtttccga tacctcttgc acctcccaa gcggtgacgg tattttctgg 720
 aacattgga ttcagaccaa agatggtcag tgcggtctc cgctggtgtc tacgcgtgac 780
 ggtttcatcg ttggtatcca ttctgcttct aacttacta acactaaca ctactttact 840
 tccgttccga aaaacttcat ggagctgctg actaaccaag aggcccagca gtgggtgtcc 900
 ggttggcgc tgaacgcaga ttctgtactg tgggtggtc ataaggtatt catgaacaaa 960
 cggaggagc cgttccagcc ggtcaaagag gcgaccagc tgatgaacga actggtttac 1020
 tctcagtaag agctctgtct cgag 1044

<210> 90

5

<211> 4851

<212> ADN

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

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

TEV con los elementos de transcripción y traducción intercalados.

20

<400> 90

ES 2 592 856 T3

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggtaaatag cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agattttaa 180
ccaccgcctg aggtaaaca ggtcccgtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttgggggtgt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtccctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatogacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taaccggaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat taccgagatg cgggcttaga agtgccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcatgat gcaaaaattt ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcacoga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggctc 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacacoga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggtt ttatcaccag caaaaccaa 1320
tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccaggcg gtggcggtgg tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcgggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcctc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggt aaacgaagcc cttttaaatc ctccgctgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcaactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtggcgccc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040
gaatttatcc cggaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgctgtgtg gtcctatatc 2100
gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacg taaccgaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280

ES 2 592 856 T3

attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
 atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
 aagttcttga accaatgtag tgcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacgggtg 2460
 aaacgtctgg aagacttoga tgcaagcctt aaagatgcc ttctgaagta tatttacgat 2520
 aatcgcgaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
 agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
 tttacggaat acatcaaaaa catcatcaac actagtattc tgaacttgcg ttacgagagt 2700
 aaccatctga ttgatctgag ccgttacgca tctaaaatca acatcggatc caaggtgaac 2760
 ttcgatccta tcgacaaaaa ccagattcaa ttgttcaact tagaatcgtc aaagattgaa 2820
 gttatcttaa aaaatgcatg tgtatataat tcaatgtacg aaaatttctc tacgagcttt 2880
 tggattcgta ttccgaaata tttcaacagt atctctttaa acaacgagta tactatcatc 2940
 aattgtatgg agaataacag cgggtggaaa gtgagcctta actatggtga aatcatctgg 3000
 actctgcagg acactcaaga aattaaacaa cgcgtggtgt ttaaatactc acagatgatt 3060
 aacatctcgg attatattaa tcgctggatt tttgtgacaa ttactaaciaa ccggctgaac 3120
 aacagcaaaa tttacattaa cggtcgctg atcgatcaga aaccaatcag taatctcgg 3180
 aacattcacg catcgaataa tatcatgctc aaactggatg gttgtcgcga cacgcaccgt 3240
 tacatttggg tcaataactt caatttattc gacaaagaac tcaacgaaaa ggagattaag 3300
 gatctttatg acaatcagtc taattcgggt attctgaaag acttttgggg tgattacctt 3360
 cagtacgata aaccgtatta tatgttaaac ttatatgatc cgaataaata cgttgacgctc 3420
 aacaacgttg gcattcgtgg ctatatgtat ctgaaagggc cgcgtggcag cgtgatgacc 3480
 actaacattt acttaaaact ctccctctat cgcggtacta aatttattat caagaaatat 3540
 gcctctggca acaaggacaa tatcgtacgc aataacgatc gcgtctacat taacgtggtg 3600
 gtgaagaata aagaatatcg tctggcgacc aatgctagtc agggcggcgt ggagaaaatt 3660
 ctgtctgcac ttgaaatccc ggatgtgggt aatttatccc aggtggtgt gatgaaaagt 3720
 aaaaatgacc aagggatcac caataaatgc aaaatgaatc tgcaagataa caacggcaac 3780
 gacattggtt ttatcggctt ccaccaatc aataaatcg cgaagcttgt ggcccaaat 3840
 tggtaaacg gtcagattga gcgcagctc cgcacttag gctgtagctg ggagttcatt 3900
 ccggtatgat acggttgggg agaacgccc ttgcaccatc atcacatca ctgagcggc 3960
 gcataatgct taagtogaac agattgatat gtagctataa gtaatcgtat tgtacacggc 4020
 cgcataatcg aaattaatac gactcactat aggggaattg tgagcggata acaattcccc 4080
 atcttagtat attagttaag tataagaagg agatatacca tgggcgaatc tctgttcaag 4140
 ggtccgcgtg attataaacc gatattcttct tctatttgtc atctgactaa cgaagcggac 4200
 ggccacacga cttctctgta cggatcgggt ttccgtccgt tcatcattac caacaagcat 4260
 ctgttccgcc gtaacaacgg taccctgctg gttcaatctc tgcaacggcgt cttcaagta 4320
 aaagacacca ctacgctgca gcagcacctg gtcgacggcc gtgacatgat catcatccgc 4380
 atgccgaaag attttccgcc gttcccgcaa aaactgaagt ttcgtgaacc gcaacgcgaa 4440
 gaacgtatth gcctggttac caccaacttt cagaccaaaa gcatgtcttc tatggtttcc 4500
 gatacctctt gcaccttccc aagcgggtgac ggtattttct ggaaacattg gattcagacc 4560
 aaagatggtc agtggggctc tccgctggtg tctacgcgtg acggtttcat cgttgggtatc 4620
 cattctgctt ctaacttcaac taacactaac aactacttta cttccgttcc gaaaaacttc 4680
 atggagctgc tgactaacca agaggcccag cagtgggtgt ccggttggcg cctgaacgca 4740
 gattctgtac tgtggggtgg tcataaggtg ttcatgaaca aaccggagga gccgttccag 4800
 ccggtcaaa aggcgaccca gctgatgaac gaactggttt actctcagta a 4851

<210> 91

5 <211> 732

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

15 <223> Variante 7 de TEV

<400> 91

20

ES 2 592 856 T3

```

atggggcgaat ctctgttcaa ggggtccgcgt gattataacc cgatatcttc ttctatttgt 60
catctgacta acgaaagcga cggccacacg acttctctgt acggtatcgg tttcgggtccg 120
ttcatcatta ccaacaagca tctgttccgc cgtaacaacg gtaccctgct ggttcaatct 180
ctgcacggcg tcttcaaggt aaaagacacc actacgctgc agcagcacct ggtcgacggc 240
cgtgacatga tcatcatcog catgccgaaa gattttccgc cgttcccgca aaaactgaag 300
tttcgtgaac cgcaacgcga agaacgtatt tgcctgggta ccaccaactt tcagaccaa 360
agcatgtctt ctatggtttc cgatacctct tgcaccttcc caagcgggta cggtatcttc 420
tggaacatt ggatccagac caaagatggt cagtgcggct ctccgctggt gtctacgcgt 480
gacggtttca tcgttgggat ccattctgct tctaacttca ctaaacactaa caactacttt 540
acttccggtc cgaaaaactt catggagctg ctgactaacc aagaggccca gcagtgggtg 600

```

```

tccggttggc gcctgaacgc agattctgta ctgtgggggtg gtcataaggt attcatgaac 660
aaaccggagg agccgttcca gccggtcaaa gaggcgacc agctgatgaa cgaactgggt 720
tactctcagt aa 732

```

<210> 92

5 <211> 415

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia intercalada que contiene sitios transcripcionales y traduccionales y sitio de terminación T7.

20 <400> 92

```

aagcttgtgg cctcaaattg gtacaaccgt cagattgagc gcagctcccg cacttttaggc 60
tgtagctggg agttcattcc ggtagatgac ggttggggag aacgcccatt gcaccatcat 120
caccatcact gagcggccgc ataatgctta agtcgaacag attgatatgt agctataagt 180
aattgtatga ctgaacctag gctgctgcc aagctgagca ataactagca taacccttg 240
ggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgatcgt atactctcag gcatctatga 300
gttgtacacg tccgcataat cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcggg 360
taacaattcc ccatcttagt atattagtta agtataagaa ggagatatac catgg 415

```

25 <210> 93

<211> 4965

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Marcos de lectura abiertos de BoNT/A-TEV y de variante 4 de proteasa TEV con los elementos de transcripción y traducción intercalados y sitio de terminación.

<400> 93

```

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tccogaatgc gggtaaagt cagcccgatg aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccgggt tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagg gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttgggggtgt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaact ttttgggcat gaagtctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taaccggaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggtt ttatcaccag caaaaccaa 1320
tccttgggcg gtgggtggcg aaacctgtac ttccaggcg gtggcggtgg tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcac aagtgaaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcgggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaatata ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaact cttcgcgtgt gtacaccttt 1800

```

5

ES 2 592 856 T3

ttctcaagcg attatggttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
 tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
 aaaattgcoy atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcaactgaa cattggtaac 1980
 atgctgtata aagatgattt tgtgggcycc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040
 gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcyctggt gtcctataatc 2100
 gcaacaaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacycgc tcagtaaacg taacgaaaaa 2160
 tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggtcgc ctaaagtaa caccagatt 2220
 gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcy ctgaaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
 attatcaact atcaatataa ccagtaacaca gaggaaagaa agaataacat caacttcaac 2340
 atcgacyact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcyatgat taatattaac 2400
 aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacgggtgtg 2460
 aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgcc ttctgaagta tatttacgat 2520
 aatcgcygaa ctcttattgg ccaagtggat cgtttaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
 agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcyccct gctgtccacg 2640
 tttacggaat acatcaaaaa catcatcaac actgatttc tgaacttgcg ttacgagatc 2700
 aacctctga ttgatctgag ccgttacgca tctaaatca acatcgatc caaggtgaa 2760
 ttgatccta tcgacaaaa ccagattcaa ttgttcaact tagaatcgtc aaagattgaa 2820
 gttatcttaa aaaatgcyat tgtatataat tcaatgtacg aaaatttctc tacgagcttt 2880
 tggattccta ttccgaaata tttcaacagt atctctttaa acaacgagta tactatcatc 2940
 aattgtatgg agaataacag cgggtggaag gtgagcctta actatggtga aatcatctgg 3000
 actctgcyag acactcaaga aattaacaa cgcgtggtgt ttaaatactc acagatgat 3060
 aacatctcgg aatataattaa tcgctggatt tttgtgacaa ttactaacia ccgctgaa 3120
 aacagcaaaa tttacattaa cgytcgcctg atcgatcaga aaccaatcag taatctcgg 3180
 aacattcacg catcgaataa tatcatgttc aaactggatg gttgtcgcga cacgcaccgt 3240
 tacatttggg tcaataactt caatttattc gacaaagaa tcaacgaaaa ggagattaag 3300
 gatctttatg acaatcagtc taattcgggt attctgaaag acttttgggg tgattacctt 3360
 cagtcagata aacogtatta tatgttaaac ttatatgatc cgaataaata cgttgacgct 3420
 aacaacygtg acattcgtgg ctatatgtat ctgaaagggc cgcgtggcag cgtgatgacc 3480
 actaacattt acttaaaact ctccctctat cgcggtacta aatttattat caagaaatat 3540
 gcctctggca acaaggacaa tatcgtacgc aataacgatc gcgtctacat taacgtgggtg 3600
 gtgaagaata aagaatatcg tctggcgacc aatgctagtc aggcgggcyt ggagaaaatt 3660
 ctgtctgcac ttgaaatccc ggatgtgggt aatttatccc aggtggttgt gatgaaaagt 3720
 aaaaatgacc aagggatcac caataaatgc aaaatgaatc tgcaagataa caacggcaac 3780
 gacattgctt ttatcggctt ccaccaattc aataatatcg cgaagcttgt ggcctcaat 3840
 tggtaacaacc gtcagattga gcyagctcc cgcactttag gctgtagctg ggagttcatt 3900
 ccggtagatg acggttgggg agaacyccca ttgcaccatc atcaccatca ctgagcggcc 3960
 gcataatgct taagtcaaac agattgatat gtagctataa gtaattgtat gactgaacct 4020
 aggtcgtcgc caccgctgag caataactag cataaccctt tggggcctct aaacgggtct 4080
 tgagggggtt tttgctgatc gtatactctc aggcactat gagttgtaca cgtccgcata 4140
 atcgaaatta atacgactca ctatagggga attgtgagcy gataacaatt ccccatctta 4200
 gtatattagt taagtataag aaggagatat accatgggcy aatctctgtt caaggtccg 4260
 cgtgattata acccgatate ttcttctatt tgtcatctga ctaacyaaag cyagggccac 4320
 acgacttctc tgtacggtat cgytttcggt ccgttcatca ttaccaacia gcatctgttc 4380
 cgcctgaaca acggtaccct gctggttcaa tctctgcacy gcgtcttcaa ggtaaaagac 4440
 accactacyc tgcagcagca cctggtcgac ggccgtgaca tgatcatcat ccgcatgccg 4500
 aaagatttcc cgcogttccc gcaaaaactg aagttcgtg aaccgcaacy cgaagaacyt 4560
 atttgcctgg ttaccaccaa cttcagacc aaaagcatgt cttctatggt ttccgatacc 4620
 tcttgacyct tcccaagcgg tgacygtatt ttctggaac attggattca gaccaaagat 4680
 ggtcagtgcy gctctccgct ggtgtctacy cgtgacygtt tcatcgttgg tatccattct 4740
 gcttctaact tcaactaacac taacaactac tttacttccg ttccgaaaaa cttcatggag 4800
 ctgctgacta accaagaggy ccagcagtyg gtgtccggtt ggcgcctgaa cgcagattct 4860
 gtactgtggg gtggtcataa ggtattcatg acaaaacyg aggagccgtt ccagccggtc 4920
 aaagagcyga cccagctgat gaacyaactg gtttactctc agtaa 4965

- 5 <210> 94
- <211> 2697
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>

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

5

<400> 94

```

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc ggggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatagc ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccgggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttgggggtgg 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accgggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccggag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaact ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgatg gaatcgccat taaccggaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgat tacgagatgt cgggcttaga agtgccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaagggtc 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatctt tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaaccocga aatcaacaac atgaaactta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttggttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggtt ttatcaccag caaagaaaaa 1320
ctgtacttcc agttcgggtg ttttaccggc gctcgtaaat ctgcacgtaa acgcaagaat 1380
caggctctgg ctgggtggcg tggtctctgt ggtggcggtt gcggcggtgg cggttctgcg 1440
ctcaatgatt tatgcatcaa ggtgaacaac tgggacttgt ttttctctcc atctgaagat 1500
aattttacta acgacttgaa caaaggagag gaaattactt ccgataccaa catcgaagca 1560
gcggaagaga atattagtct agatcttatt caacaatatt acctgacctt taattttgat 1620
aacgagcctg agaacatttc cattgagaat ctgagctctg acatcatcgg ccagctggaa 1680
ctgatgccga atatcgaacg ctttccta at ggaaagaaat atgaattgga caaatacacc 1740
atgttccact atctccgcgc gcaggagttt gagcacggca agtctcgtat tgctctgacc 1800
aattcggtaa acgaagccct tttaaatcct tcgctgtgtg acacctttt ctcaagcgat 1860
tatgttaaaa aagtgaacaa ggcgaccgaa gcggcgatgt ttttgggatg ggtggaacaa 1920
ctggtatagc actttacgga tgaaacttct gaagtctcga ccaccgacaa aattgccgat 1980
attaccatta tcattcccta tattggccct gcaactgaaca ttggtaacat gctgtataaa 2040
gatgattttg tgggcccctt gatcttttca ggcgctgtta tctctgctgga atttatcccg 2100
gaaatcgcca ttccagta ct cggtaacctt gcgctggtgt cctatatcgc aaacaaagt 2160
ttgactgtcc agacgatcga caacgcgctc agtaaacgta acgaaaaatg ggatgaggtg 2220
tataagtata ttgttacc aa ctggctcgtc aaagtaacaa cccagattga cctgattcgc 2280
aagaagatga aagaagcgtc ggaaaaccaa gcagaagcga ccaaagctat tatcaactat 2340
caatataacc agtacacaga ggaagaaaag aataacatca acttcaacat cgacgactta 2400
tcttcaaagc tgaatgaatc tattaacaaa gcgatgatta atattaacaa gttcttgaac 2460
caatgtagtg tcagctatct gatgaactcg atgatccctt acggtgtgaa acgtctggaa 2520
gacttcgatg caagccttaa agatgccctt ctgaagtata ttacgataa tcgcggaact 2580
cttattggcc aagtggatcg cttaaaagat aaagtcaaca acacgctgag tacagacatc 2640
ccttttcagc tgtctaataa tgtggacaat cagcgcacc atcaccatca cactaa 2697

```

10 <210> 95

<211> 898

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> NociLHN/A-TEV

<400> 95

5

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

ES 2 592 856 T3

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65 70 75 80
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85 90 95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100 105 110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115 120 125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130 135 140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145 150 155 160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165 170 175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180 185 190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195 200 205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210 215 220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225 230 235 240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245 250 255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260 265 270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275 280 285
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290 295 300
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305 310 315 320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
325 330 335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340 345 350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355 360 365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
370 375 380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385 390 395 400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
405 410 415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Phe Gly Gly Phe
435 440 445
Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Arg Lys Asn Gln Ala Leu Ala
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
465 470 475 480
Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser
485 490 495
Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
500 505 510
Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
515 520 525
Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu
530 535 540
Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
545 550 555 560
Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu

				565					570					575		
Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu	His	
			580					585					590			
Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu	
		595					600					605				
Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	
	610					615					620					
Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Gln	
	625				630					635					640	
Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr	Asp	
			645						650					655		
Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	
			660					665					670			
Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	
		675					680					685				
Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	
	690					695					700					
Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys	Val	
	705				710					715					720	
Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Lys	
				725					730					735		
Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys	Val	
			740					745					750			
Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	Glu	
	755						760					765				
Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Gln	
	770					775					780					
Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp	Leu	
	785				790					795					800	
Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	Asn	
				805					810					815		
Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile	
			820					825					830			
Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp	
		835					840					845				
Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln	
	850					855					860					
Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Ile	
	865				870					875					880	
Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	His	His	His	His	
				885				890						895		
His	His															

<210> 96

5 <211> 2709

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto para DynLHN/A-TEV

<400> 96

20

ES 2 592 856 T3

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
 tatatcaaaa tcccgaatgc gggcctaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
 aaaatttggg tgatcccga ggcgatacgt ttcacgaacc cggagaagg agattttaa 180
 ccaccgctg aggctaaaca ggtcccgtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagg gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
 acagatctcg gtgcgatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttgggggtgg 360
 agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
 gatgggagct accggctcga agagcttaac ctgcgtaatca ttggcccag cgcggatatt 480
 atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540

ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
 gaagttgata cgaaccctct ttttaggcgcg ggaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttctatg gaatcgccat taaccggaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cgggcttaga agtgccttt 780
 gaagaactgc gcacgtttgg cggcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgttt caaagaaaa 960
 tacctcctta gogaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
 ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 tttaacggcc agaaccacga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgtggta ttatcaccag caaagaaaac 1320
 ctgtacttcc agtatggcgg tttcctgctg cgcatctgtc ctaagcttaa atgggataac 1380
 caggctcttg ctgggtgggg ttggtctggg ggtggcggta gcggcgggtg ttggttctgca 1440
 ctcaatgatt tatgtatcaa ggtgaacaac ttggacttgt ttttctctcc atctgaagat 1500
 aattttacta acgacttgaa caaaggagag gaaattactt ccgataccaa catcgaagca 1560
 gcggaagaga atattagtct agatcttatt caacaatatt acctgacctt taattttgat 1620
 aacgagcctg agaacatttc cattgagaat ctacgctctg acatcatcgg ccagctggaa 1680
 ctgatgccga atatcgaacg ctttccctaat ggaagaaat atgaattgga caaatacacc 1740
 atgttccact atctccgctc gcaggagttt gagcacggca agtctcgtat tgctctgacc 1800
 aattcggtaa acgaagccct tttaaatcct tgcgctgtgt acacctttt ctcaagcgt 1860
 tatgttaaaa aagtgaacaa ggcgaccgaa gcggcgtatg ttttgggatg ggtggaacaa 1920
 ctggtatatg actttacgga tgaaacttct gaagtctoga ccaccgacaa aattgccgat 1980
 attaccatta tcattcccta tattggccct gcactgaaca ttggtaacat gctgtataaa 2040
 gatgattttg tgggcgccct gatcttttca ggcgctgta tccctgctgga atttatcccg 2100
 gaaatcgcca ttccagctact cggtaccttt gcgctggtgt cctatatcgc aaacaaagtt 2160
 ttgactgtcc agacgatcga caacgcgctc agtaaacgta acgaaaaatg ggatgaggtg 2220
 tataagtata ttgttaccga ctggctcgtc aaagttaaaca cccagattga cctgattcgc 2280
 aagaagatga aagaagcgtc ggaaaaccaa gcagaagcga ccaaagctat tatcaactat 2340
 caatataacc agtacacaga ggaagaaaag aataacatca acttcaacat cgacgactta 2400
 tcttcaaacg tgaatgaatc tattaacaaa gcgatgatta atattaacaa gttcttgaac 2460
 caatgtagtg tcagctatct gatgaactcg atgatccctt acggtgtgaa acgtctggaa 2520
 gacttcgatg caagccttaa agatgcctt ctgaagtata ttacgataa tcgcggaact 2580
 cttattggcc aagtggatcg cttaaaagat aaagtcaaca acacgctgag tacagacatc 2640
 ccttttcagc tgtctaataa tgtggacaat cagcgcctgc tgtccacgca ccatcaccat 2700
 caccactaa 2709

<210> 97

5 <211> 902

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> DynLHN/A-TEV

<400> 97

ES 2 592 856 T3

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

ES 2 592 856 T3

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Tyr Gly Gly Phe
 435 440 445
 Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Asn Gln Ala Leu Ala
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 465 470 475 480
 Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser
 485 490 495
 Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
 500 505 510
 Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
 515 520 525
 Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu
 530 535 540
 Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
 545 550 555 560
 Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
 565 570 575
 Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
 580 585 590
 Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
 595 600 605
 Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys
 610 615 620
 Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln

ES 2 592 856 T3

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

<210> 98

5 <211> 320

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Fragmento de ADN que codifica una región de bucle bicatenario

que comprende un dominio de unión de Galanina al sitio de escisión

de proteasa TEV integrado

20

<400> 98

```

gaattctaca agctgctgtg cgtggacggc atcattacct ccaaaactaa atctgaaaac 60
ctgtacttcc agggctggac tttgaactct gctggttatc tcctgggccc acatgcggtt 120
gctcttgctg gtggcgggtg ctctggcggg ggcggtagcg gcggtggcgg ttctgcacta 180
gtgcttcagt gtatcaaggt taacaactgg gatttattct tcagcccagag tgaagacaac 240
ttaccaaacg acctgaacaa aggtgaagaa atcacctcag atactaacat cgaagcagcc 300
gaagaaaaca tcagtctaga                                     320

```

25

<210> 99

<211> 106

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Región de bucle bicatenario que comprende un dominio de unión de galanina
al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado

15

<400> 99

<400> 99

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

20

<210> 100

<211> 2703

25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Marco de lectura abierto para GalLHN/A-TEV

35

<400> 100

ES 2 592 856 T3

```

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc ggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcatagc ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaca ggtcccgggt tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttgggggtgg 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accgggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccagag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtoctga atctgacgog gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg ttttctcca gatctcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg gaaaaattcg cgacggacc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taaccggaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcattgt gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
ttgaatcggg aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgocga atacgaatct ggcggcgaac 1200
ttaaaccggc agaaccocga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctacaa gctgctgtgc gtggacggca tcattacctc caaaactaaa 1320
tctgaaaaacc tgtacttcca gggctggact ttgaaactctg ctggttatct cctgggcca 1380
catgcccgtg ctcttctgtg tggcgggtgg tctgcccgtg gcggtagcgg cgggtggcgg 1440
tctgcactag tgcttcagtg tatcaaggtt aacaactggg atttattctt cagcccaggt 1500
gaagacaact tcaccaacga cctgaacaaa ggtgaagaaa tcacctcaga tactaacatc 1560
gaagcagccg aagaaaacat cagtctagat cttattcaac aatattacct gacctttaat 1620
tttgataacg agcctgagaa catttccatt gagaactca gctctgacat catcggccag 1680
ctggaactga tgccgaatat cgaacccttt cctaatggaa agaaatatga attggacaaa 1740
tacaccatgt tccactatct ccgcgcgag gagtttgagc acggcaagtc tcgtattgct 1800
ctgaccaatt cggtaaacga agccctttta aatccttcgc gtgtgtacac ctttttctca 1860
agcgattatg ttaaaaaagt gaacaaggcg accgaagcgg cgatgttttt gggatgggtg 1920
gaacaactgg tatatgactt tacggatgaa acttctgaag tctcgaccac cgacaaaatt 1980
cccgaatta ccattatcat tccctatatt ggcctgcac tgaacattgg taacatgctg 2040
tataaagatg attttgtggg cgccctgatc ttttcaggcg ctgttatcct gctggaattt 2100
atcccggaaa tcgccattcc agtactcggg acctttgcgc tgggtgccta tatcgcaaac 2160

```

```

aaagttttga ctgtccagac gatcgacaac gcgctcagta aacgtaacga aaaatgggat 2220
gaggtgtata agtatattgt taccaactgg ctcgctaaag taaacaccca gattgacctg 2280
attcgcaaga agatgaaaga agcgtggaa aaccaagcag aagcgaccaa agctattatc 2340
aactatcaat ataaccagta cacagaggaa gaaaagaata acatcaactt caacatcgac 2400
gacttatctt caaagctgaa tgaatctatt aacaaagcga tgattaatat taacaagttc 2460
ttgaaccaat gtagtgtcag ctatctgatg aactcgatga tccttacggg tgtgaaacgt 2520
ctggaagact tcgatgcaag ccttaaagat gcccttctga agtatattta cgataatcgc 2580
ggaactctta ttggccaagt ggatcgctta aaagataaag tcaacaacac gctgagtaca 2640
gacatccctt ttcagctgtc taaatatgtg gacaatcagc gccaccatca ccatcaccac 2700
taa 2703

```

<210> 101

5 <211> 900

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> GalLHN/A-TEV

<400> 101

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 20 25 30
 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
 35 40 45
 Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
 50 55 60
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
 100 105 110
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

			340					345				350			
Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
			355				360					365			
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr
			370				375					380			
Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn
385					390					395					400
Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu
				405					410					415	
Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Asp
			420					425					430		
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly
			435				440					445			
Trp	Thr	Leu	Asn	Ser	Ala	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Ala	Val	Ala
			450			455					460				
Leu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
465					470					475					480
Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe
				485					490					495	
Phe	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu
			500					505					510		
Glu	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser
			515				520					525			
Leu	Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu
			530			535					540				
Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln
545					550					555					560
Leu	Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr
			565						570					575	
Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe
			580				585						590		
Glu	His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala
			595				600					605			
Leu	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val
			610			615					620				
Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val
625					630					635					640
Glu	Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr
				645					650					655	
Thr	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro
			660					665					670		
Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala
			675				680					685			
Leu	Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile
			690			695					700				
Ala	Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn
705					710					715					720
Lys	Val	Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn
				725					730					735	
Glu	Lys	Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala
			740					745					750		
Lys	Val	Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala
			755				760					765			
Leu	Glu	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr
			770			775					780				
Asn	Gln	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp
785					790					795					800
Asp	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn
				805					810					815	
Ile	Asn	Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser
			820					825					830		
Met	Ile	Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu
			835				840						845		

ES 2 592 856 T3

```

Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile
 850                               855                               860
Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr
 865                               870                               875                               880
Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg His His
 885                               890                               895
His His His His
 900

```

<210> 102

5 <211> 314

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Fragmento de ADN que codifica una región de bucle bicatenario
que comprende un dominio de unión de nociceptina al sitio de
escisión de proteasa TEV integrado

20

<400> 102

```

gaattctata agctcctgtg tgtccgcggt attatcacca gcaaagaaaa cctgtacttc 60
cagttcgggt gttttaccgg cgctcgtaaa tctgcacgta aacgcaagaa tcaggctctg 120
gctgggtggcg gtggctctgg tggcggcggt agcggcggtg gcggttctgc gctcaatgat 180
ttatgcatca aggtgaacaa ctgggacttg ttttctctc catctgaaga taattttact 240
aacgacttga acaaaggaga ggaaattact tccgatacca acatcgaagc agcgggaagag 300
aatattagtc taga                                     314

```

25

<210> 103

30 <211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

40 <223> Región de bucle bicatenario que comprende un dominio de unión de nociceptina
al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado

45 <400> 103

ES 2 592 856 T3

```

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

```

<210> 104

5 <211> 314

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Fragmento de ADN que codifica una región de bucle bicatenario que

comprende un dominio de unión de dinorfina al sitio de escisión

20 de proteasa TEV integrado

<400> 104

```

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

```

25

<210> 105

30 <211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

40 <223> Región de bucle bicatenario que comprende un dominio de unión de dinorfina

al sitio de escisión de la proteasa TEV integrado

45 <400> 105

ES 2 592 856 T3

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

<210> 106

5 <211> 750

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco de lectura abierto que codifica la variante 7 de proteasa TEV

<400> 106

20 ccatggatgg gtggcgaatc tctgttcaag ggtccgcgtg attataaccc gatatcttct 60
 actatattgtc atctgactaa cgaaagcgac ggccacacga cttctctgta cggtatcggg 120
 ttcggtccgt tcatcattac caacaagcat ctgttccgcc gtaacaacgg taccctgctg 180
 gtccaatctc tgcacggcgt cttcaaggta aaagacacca ctacgctgca gcagcacctg 240
 gtcgacggcc gtgacatgat catcatccgc atgccgaaag attttccgcc gttcccgcaa 300
 aaactgaagt ttcgtgaacc gcaacgcgaa gaacgtattt gcctggttac caccaacttt 360
 cagacaaaaa gcatgtcttc tatggtttcc gatacctctt gcaccttccc aagcgggtgac 420
 ggtatatttct ggaaacattg gatccagacc aaagatggtc agtgcggtc tccgctgggtg 480
 tctacgcgtg acggtttcat cgttggtatc cattctgctt ctaacttcac taactactaac 540
 aactacttta cttccggttc gaaaaacttc atggagctgc tgactaacca agaggcccag 600
 cagtgggtgt ccggttggcg cctgaacgca gattctgtac tgtgggggtg tcataaggta 660
 ttcataaaca aaccggagga gccgttccag ccggtcaaag aggcgaccca gctgatgaac 720
 gaactggttt actctcagta atgaaagctt 750

<210> 107

25 <211> 3791

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> MLA que codifica la variante 7 de p10-TEV y polH-DynLHn/A-TEV

<400> 107

40

ES 2 592 856 T3

agatcttatg	cgggcgcact	cgagtcatta	gtggtgatgg	tgatggtggg	ttgacagaag	60
tctctgatta	tcaacatact	tcgacagttg	gaacgggatg	tctgttgaca	gagtggtgtt	120
taccttatct	ttcagacggt	caacttggcc	aatgagcggt	cccctgttat	cgtagatgta	180
cttaagaag	gcgtctttca	gcgaggcgtc	gaagtccctc	agtctcttta	caccatatgg	240
gatcattgag	ttcatcaagt	atgatacact	gcattggttg	aggaacttgt	taatgtttat	300
cattgccttg	tttatgctct	cgttgagttt	actagagagg	tcgtcaatgt	tgaagttgat	360
gttgttcttt	tctcctcgg	tgtactgggt	gtactgatag	ttaatgatgg	cctttgtcgc	420
ttcagcctgg	ttctccagcg	cctccttcat	ctttttcctg	atgaggtcga	tttgggtgtt	480
gaccttagcg	agccagttag	tcacgatgta	tttgtacact	tcacccact	tctcgtttct	540
ttttgacaga	gcattatcga	ttgtttggac	agtgaggacc	ttgtagcaa	tgtagctgac	600
caaagcgag	gtaccaagaa	caggaatagc	gatctctggg	atgaactcca	acaaaatcac	660
tgctcccag	aaaatcaacg	caccgacgaa	gtcgtccttg	tacagcatat	tgccgatgtt	720
aagagcaggt	ccaatgtagg	gtatgatgat	agtgatgtct	gcgatcttgt	ccgtagtcga	780
aacttcacta	gtctcgtcgg	tgaaatcgta	aaccaactgt	tcaaccac	ccagaaacat	840
cgctgcttcg	gttgcttcat	tcaccttctt	aacgtaatcc	gaactgaaga	aggtgtagac	900
acgagaagga	ttgagaagag	cctcgttgac	cgagttagtg	agggcgattc	tactttttcc	960
gtgctcaaac	tcttgagctc	tgaggtagtg	gaacatcgtg	tatttgtcca	attcgtactt	1020
cttgccgtta	gggaatctct	cgatattggg	catgagttcc	agctgtccga	tgatgtcgtc	1080
gctcagattt	tcgatagaaa	tgttttccgg	ctcgttatcg	aaattgaacg	tgagatagta	1140
ctgctgaatc	aggtctagac	taatattctc	ttccgctgct	tcgatgttgg	tatcggaagt	1200
aatttcctct	cctttgttca	agtcgtagt	aaaattatct	tcagatggag	agaaaaacaa	1260
gtcccagttg	ttcaccttga	tacataaatc	attgagtgca	gaaccaccac	cgccgctacc	1320
gccaccacca	gagccaccac	caccagcaag	agcctggtta	tcccatttaa	gcttaggacg	1380
aatgcacaca	aggaaccgcg	catactggaa	gtacaggttt	tctttgctgg	tgataatacc	1440
acggcacac	aggagcttat	agaattcaaa	caggccggtg	aaattcttga	gctttgtgaa	1500
gttcatgtta	ttgatctcgg	tattctgacc	attgaagtta	gccgccaaat	tggtgttcct	1560
aaggttaaag	ccatcataga	tggtgtagtt	cacctttggc	acgatattga	tcttaaacac	1620
agctttgtcg	aagttaagat	aagtcttgcg	gttcaatacc	ttgaagaact	taacaaagtt	1680
gtcctcggta	tagatctctg	taagcatttt	gtacagcttg	tcaaacttga	gtttgtccac	1740
gtaaaacttt	coggaggtgt	cctcggaaag	caagtacttt	tccttaaaaga	cgttcttcat	1800
taactgaagg	ctagccgtgg	tgccgactat	acttttagcc	ttattcagcg	tactggcaat	1860
atctttgaat	ttgttgtagt	aatacagtct	gaactcattc	tcttgcaagg	agtcgatgaa	1920
cttagcatcg	tgtccaccga	aggtacgaag	ttcttcgaag	gagactcca	gaccggacat	1980
ctcatagtat	gcgttggtgt	tcaccttgaa	aacgcggttt	ggattgatgg	caattccgta	2040
cagtctatgg	cctgocgtgaa	tcagctcgtg	agccaaggtc	accgcgggat	ctgtggcgaa	2100
cttgccacac	cccaacaacg	gattagtgtc	aacctccaat	gactcttcca	agccgaaagt	2160
gaaatcgggg	gaaaacctga	tgtattgagt	agaaccataa	ccgtttctgg	tcaggttcag	2220
cacctcatgg	ccgaaggact	tacattcaaa	ctgaatgatg	tcggcagagg	gaccgatgat	2280
caccaagttg	agttcctctg	aacggtagga	gocgtcaggt	tggatcacgt	tgatacagtt	2340
tgtatcgatc	actttcagct	ctgtatctat	ggttgatccg	ccccaaaagg	ggattccacg	2400
gacgatggaa	gtgagcagca	tgcgaccgag	gtcagtggaa	tagatacgtc	cgaaaagttt	2460
ggtcactccc	ttgaggtaat	tgtctttctc	gttatctgtc	gacaagtacg	tggagtcata	2520
gtaggacacc	ggcaactgct	tggcctctgg	tggcggattc	aaatctcctt	cttcggggtt	2580
agtgaaggtg	tctctttcgg	gaatgaccca	tatcttgta	tgaatcttga	aggccttaac	2640
aggctgcatt	tgaccggcat	tcggaatctt	gataacgca	atatcgactc	cgttgacagg	2700
gtccttatag	ttgaattgct	tgttgacaaa	tcctatggga	ttatatattat	aggttttttt	2760
attacaaaac	tgttacgaaa	acagtaaaat	acttatttat	ttgcgagatg	gttatcattt	2820
taattatctc	catgatccaa	taacctagaa	taaaggccga	cctttaattc	aacccaacac	2880
aatatattat	agttaaataa	gaattattat	caaatcattt	gtatattaat	taaaatacta	2940
tactgtaaat	tacattttat	ttacaatcac	agatccatat	gggagagtca	ttgttcaagg	3000
gaccgagaga	ttacaacccc	atctcgtcgt	caatctgcca	cttgacaaac	gaatccgacg	3060
gtcacactac	ttctctgtac	ggtatcggct	tcggaccttt	catcatcacc	aacaagcatt	3120
tgtttaggag	aaacaacggt	acactccttg	tccagtccct	gcacggcgta	ttcaaagtca	3180
aaatataacc	gactctgcaa	cagcatctgg	tcgacggaag	ggacatgata	atcattcgca	3240
ttcctaagaa	ttcccacccc	ttcctcmeta	agctcaagtt	tcgtgagccc	cagcgtgag	3300
agaggatttg	tcttgtcacg	actaacttcc	agaccaaate	tatgtctagc	atggtcagcg	3360
atacctcgtg	cacttttcca	agcggcgatg	gaatcttttg	gaagcactgg	attcagacaa	3420
aggacggcca	atgcgggttct	cctctcgtaa	gtacgcgcga	cggattcatc	gtgggtattc	3480

ES 2 592 856 T3

actccgcttc	caacttcacc	aacaccaaca	actatttcac	tagcgtgcca	aagaatttca	3540
tggaattgct	caccaaccag	gaggcccaac	aatgggttag	tggttggcgt	cttaatgcgg	3600
actcagtgct	gtggggaggc	cataaagttt	tcatgaataa	gccggaggaa	ccttttcaac	3660
ccgtgaagga	agcaacacag	ctcatgaatg	agctggttta	ctcacagtga	taactcgagc	3720
aatctgatac	tagtaataaa	agatgtttat	tttcattaga	tgtgtgtgtt	ggttttttgt	3780
ctatagcatg	c					3791

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento intracelular para convertir una proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 a) hacer crecer una célula que comprende una construcción de expresión dual a una primera temperatura durante un cierto período de tiempo para alcanzar una densidad celular máxima, comprendiendo la construcción de expresión dual;
- 10 i) un marco de lectura abierto que codifica una proteína de cadena sencilla que comprende una región de bucle bicatenario que comprende un sitio de escisión de la proteasa TEV exógeno; y
- 15 ii) un marco de lectura abierto que codifica una proteasa TEV; en el que la proteasa puede escindir el sitio de escisión de proteasa exógeno situado en la región de bucle bicatenario.
- 20 b) hacer crecer la célula a una segunda temperatura durante un cierto periodo de tiempo para alcanzar la inducción máxima de la expresión proteica del marco de lectura abierto que codifica la proteína de cadena sencilla, en el que el crecimiento en la etapa (b) induce la expresión de la proteína de cadena sencilla y la proteasa a partir de la construcción de expresión dual; y
- en el que la proteasa producida escinde la proteína de cadena sencilla en el sitio de escisión de proteasa exógeno situado en la región de bucle bicatenario, convirtiendo así la proteína de cadena sencilla en su forma bicatenaria.
2. El procedimiento intracelular según la reivindicación 1, en el que la célula se hace crecer en la etapa a) a 37 °C durante aproximadamente 3,5 horas, en el que la construcción de expresión dual comprende:
- 25 un marco de lectura abierto que codifica una toxina costridial de cadena sencilla, comprendiendo la toxina costridial de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión y una región de bucle bicatenario que comprende el sitio de escisión de la proteasa TEV exógeno; y
- 30 y en el que la célula se hace crecer en la etapa b) a 22 °C durante de aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas,
- 35 en el que el dominio enzimático de la toxina costridial es un dominio enzimático BoNT/A.
3. El procedimiento intracelular según la reivindicación 1, en el que la célula se hace crecer en la etapa a) a 37 °C durante aproximadamente 3,5 horas, en el que la construcción de expresión dual comprende:
- 40 un marco de lectura abierto que codifica una toxina costridial de cadena sencilla, comprendiendo la toxina costridial de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión y una región de bucle bicatenario que comprende el sitio de escisión de la proteasa TEV exógeno; y
- 45 y en el que la célula se hace crecer en la etapa b) a 22 °C durante aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas,
- en el que el dominio de translocación de la toxina costridial es un dominio de translocación BoNT/A.
4. El procedimiento intracelular según la reivindicación 1, en el que la célula se hace crecer en la etapa a) a 37 °C durante aproximadamente 3,5 horas, en el que la construcción de expresión dual comprende:
- 50 un marco de lectura abierto que codifica una toxina costridial de cadena sencilla, comprendiendo la toxina costridial de cadena sencilla un dominio enzimático, un dominio de translocación, un dominio de unión y una región de bucle bicatenario que comprende el sitio de escisión de la proteasa TEV exógeno
- 55 y en el que la célula se hace crecer en la etapa b) a 22 °C durante de aproximadamente 16 a aproximadamente 18 horas,
- en el que el dominio de unión de la toxina costridial es un dominio de unión BoNT/A.

FIG. 1.

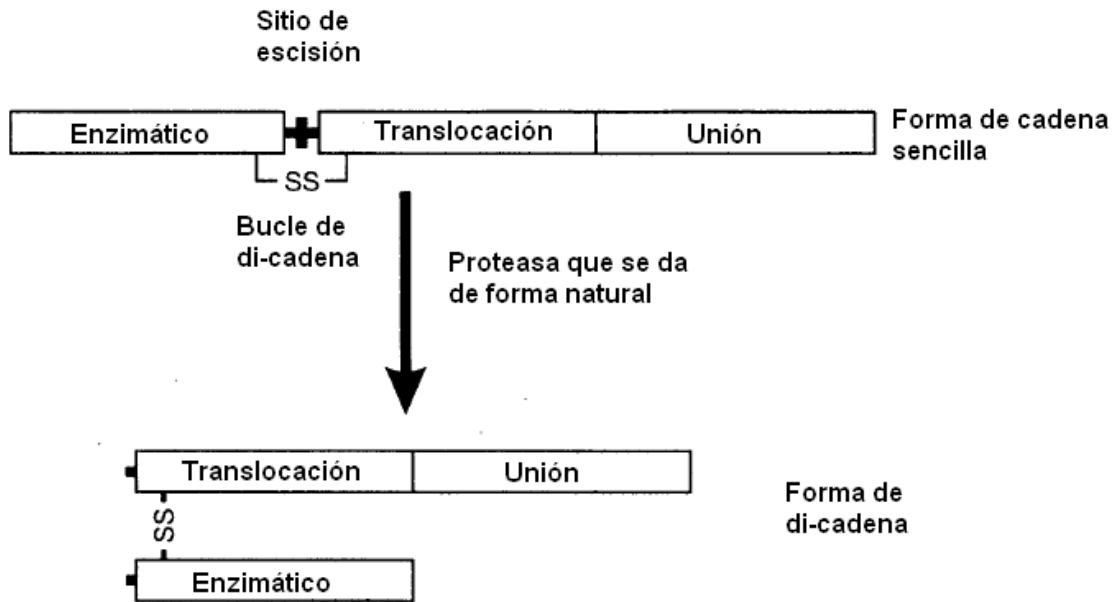


FIG. 2a.

