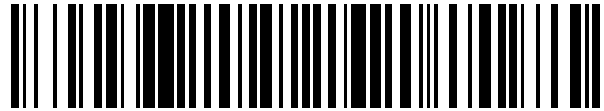


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 002**

21 Número de solicitud: 201531862

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.12.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.07.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070917

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (90.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla ES y
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (10.0%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Óscar;
OLIVER MARTOS , Begoña;
ÓRPEZ ZAFRA, Teresa;
LEYVA FERNÁNDEZ, Laura y
PAVÍA MOLINA, José

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Uso de la proteína IFNAR como antiviral**

57 Resumen:

Uso de la proteína IFNAR como antiviral.

La presente invención se refiere al uso de la proteína IFNAR en la elaboración de un medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

ES 2 626 002 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína IFNAR como antiviral

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y se refiere al uso del receptor soluble IFNAR2.3 aislado, producido de manera recombinante, en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Los avances producidos en la terapia de las enfermedades virales son de menor magnitud que los que se han conseguido para el tratamiento de las infecciones bacterianas. El desarrollo de agentes antivirales de amplio espectro altamente eficaces es un objetivo primordial compartido por los campos de la virología y la farmacología.

15

Los virus son parásitos intracelulares que utilizan la maquinaria metabólica de la célula hospedadora infectada. Por tanto, el desarrollo de antivirales presenta una serie de dificultades asociados a dicho carácter parasitario obligado. Es complicado alcanzar una actividad antiviral adecuada sin afectar al metabolismo de la célula hospedadora y sin
20 causar efectos negativos en otras células no infectadas del organismo.

20

Las estrategias actuales de control de la infectividad viral se basan en la identificación de agentes capaces de intervenir en los pasos esenciales de la infección viral, como la entrada (fusión, endocitosis), replicación, ensamblaje, además de fármacos dirigidos frente a la
25 envoltura viral. Otra estrategia iría dirigida a la modulación del sistema de defensa celular.

25

La identificación de agentes antivirales de amplio espectro focalizados en disminuir la infectividad viral o para modular las defensas del huésped supondría una contribución importante en el campo de la virología para la mejora de la salud humana y control
30 epidemias virales.

30

El IFN β ejerce su actividad biológica a través de la interacción con el receptor de superficie IFNAR formado por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Tras la unión del IFN β a IFNAR2, se produce la dimerización de las dos subunidades y la activación de la cascada de
35 señalización intracelular cuya señal es transducida al núcleo a través de la vía Jak-Stat. De

35

esta forma se ejercen las actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras del IFN β .

5 La subunidad IFNAR2 del receptor sufre un procesamiento alternativo del ARNm que da lugar a tres isoformas distintas: una isoforma corta (IFNAR2b), una isoforma larga funcionalmente activa (IFNAR2c) y la isoforma soluble (sIFNAR2, IFNAR2.3 o IFNAR2a). Solamente IFNAR2c actúa como receptor funcional junto con IFNAR1 y es capaz de mediar los efectos biológicos del IFN β . sIFNAR2 que carece de dominios citoplasmáticos y transmembrana, ha sido identificada en fluidos biológicos humanos y aunque su papel no está definido, se ha sugerido que pueda tener capacidad neutralizante de la unión del IFN β con el receptor IFNAR2. De esta forma podría ejercer funciones moduladoras según la concentración a la que se encuentre; por un lado podría neutralizar la unión del IFN β al receptor IFNAR o por el contrario, prolongar la vida media del IFN β circulante, impidiendo su degradación o la formación de oligómeros. A día de hoy sigue siendo desconocida la función de la variante soluble de IFNAR2.

Los inventores de la presente invención han comprobado el efecto antiviral de una proteína recombinante sIFNAR2, análoga a la isoforma soluble del receptor de IFN β .

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una proteína recombinante, de ahora en adelante proteína recombinante de la invención, obtenible por un procedimiento que comprende:

- 25 a) integrar un inserto con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 en una construcción genética o un vector de expresión,
- b) transformar un hospedador con el vector de expresión del paso (a),
- c) inducir la expresión de la proteína recombinante,
- d) extraer la proteína recombinante, y
- 30 e) purificar la proteína recombinante,

en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el vector de expresión es el vector prelinearizado pEcoli-Cterm 6xHN Linear.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el hospedador del paso (b) son bacterias de expresión. Preferiblemente, las bacterias de expresión son bacterias *E.coli* BL21(DE).

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la integración de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 del paso (a) se realiza mediante un proceso de ligación.

En otra realización preferida de la invención, en la ligación se emplea un liofilizado que comprende la enzima In-Fusion.

10

En otra realización preferida, el inserto se sintetizó empleando los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

15

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de de un anticuerpo o un fragmento del mismo, de ahora en adelante anticuerpo de la invención, que reconoce específicamente la proteína recombinante de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

20

En una realización preferida de este aspecto de la invención, donde el anticuerpo se obtiene por inyección de la proteína recombinante de la invención en un animal apropiado, y recogida, y opcionalmente por purificación de los antisueros de los animales.

25

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

30

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2,
- b) la proteína recombinante de la invención,
- c) la proteína de la invención (IFNAR2 soluble, sIFNAR2 o IFNAR2.3) obtenida por otros medios no recombinantes, y/o
- d) el anticuerpo, o un fragmento del mismo, de la invención,

en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

35

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica que opcionalmente además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende otro principio activo. Preferiblemente, este principio activo se selecciona de la lista que consiste en otros antivirales, analgésicos, antipiréticos, descongestivos u otros principios activos utilizados en el tratamiento de enfermedades víricas.
- 10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad viral es generada por un virus que se selecciona de la lista que consiste en: virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE), virus de la hepatitis F o G (VHG), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus de la
- 15 encefalomiocarditis, virus de la estomatitis vesicular o cualquiera de sus combinaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Bioensayo representativo realizado en presencia de IFNAR2.3. Mayor intensidad en el color violeta, se corresponde con una mayor supervivencia celular tras la infección del cultivo celular con el virus.

Figura 2. Representación de los valores de Absorbancia obtenidos en el Bioensayo anterior en cada una de las condiciones. Se puede observar como IFNAR2.3 protege a las células de la acción del virus, quedando los valores de absorbancia muy cercanos al control celular y muy por encima del control viral.

Figura 3. Diagrama de barras representando los valores de absorbancia obtenidos con las tres concentraciones de sIFNAR2 probadas. Los resultados representan la media de las 8 réplicas que se han realizado para cada una de las concentraciones. Se puede observar como sIFNAR2 protege a las células de la acción del virus, quedando los valores de absorbancia muy por encima del control viral de forma estadísticamente significativa ($p=0.012$ en todas las comparaciones).

Figura 4. Segunda placa de Bioensayo realizado en presencia de sIFNAR2, mostrando su capacidad antiviral. Además se ha realizado el bioensayo en presencia de B18R, que es un inhibidor del IFN β . Se demuestra que B18R bloquea la acción del IFN β pero no bloquea la acción de la proteína sIFNAR2 recombinante, se observa como las células permanecen protegidas en presencia de B18R+sIFNAR2.

Figura 5. Diagrama de barras representando las absorbancias obtenidas en el bioensayo de la figura 4, del control viral (CV), control celular (CC), IFN40 e IFN80. Además se representan las absorbancias obtenidas para IFN β y sIFNAR2 en presencia de B18R. Se puede observar como B18R inhibe la acción del IFN β y las células no quedan protegidas. Sin embargo, B18R no inhibe la capacidad antiviral de sIFNAR2 recombinante, quedando la absorbancia por encima del CV.

Figura 6. Gráfica representando las absorbancias del bioensayo de la figura 4 en función de las distintas diluciones obtenidas en presencia de IFN β sólo, de la combinación de IFN β +sIFNAR2 y de sIFNAR2 *per se*. Se muestra que sIFNAR2 recombinante protege el cultivo celular de la misma forma que lo hace el IFN β . Por otro lado, se puede observar como en la mayoría de las diluciones, la combinación de ambas moléculas protege más el cultivo celular, obteniéndose una absorbancia más alta. sIFNAR2 parece potenciar el efecto del IFN β y viceversa.

Figura 7. Esquema de trabajo de la clonación, producción y purificación la proteína recombinante.

Figura 8. Estructura del vector pEcoli-Cterm 6xHN Linear.

Figura 9. Estructura de las estructuras flanqueantes al inserto.

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa del amplificado obtenido por PCR.

Figura 11. Alineamientos de las secuencias nucleotídicas en sentido 5'-3'. En la primera línea se muestra la secuencia nucleotídica de IFNAR2.3 en la segunda y tercera línea las secuencias nucleotídicas con los cebadores flanqueantes del inserto T7UP y T7terminal, obtenida tras el proceso de secuenciación del plásmido.

Figura 12. Identificación de la proteína sIFNAR2 por MALDI-OF

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

USO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han estudiado los efectos del uso de una proteína recombinante de sIFNAR2 en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

Concretamente, se ha usado la proteína sIFNAR2, clonada y purificada. Además, mediante el método de clonación empleado se ha añadido una cola de histidina-asparagina en el extremo carboxi terminal, quedando fusionado a la proteína recombinante como una

etiqueta. Tras la producción de la proteína recombinante en la célula hospedadora, se hace pasar el lisado celular por una columna de afinidad para su purificación. La proteína de fusión con la etiqueta queda retenida en la columna mientras que las otras proteínas y otros contaminantes son afluidos a través de ésta.

5

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una proteína recombinante, de ahora en adelante proteína recombinante de la invención, obtenible por un procedimiento que comprende:

10

- a) integrar un inserto con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 en una construcción genética o un vector de expresión,
- b) transformar un hospedador con el vector de expresión del paso (a),
- c) inducir la expresión de la proteína recombinante,
- d) extraer la proteína recombinante, y
- e) purificar la proteína recombinante,

15

en la elaboración de un medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

El diseño del vector basado en técnicas de ingeniería genética y la elección de la célula hospedadora determinan, en gran parte, las características de la proteína recombinante.

20

La construcción génica del apartado a) puede comprender, además de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, elementos que regulan la expresión de dicha secuencia. Dichos elementos reguladores incluyen promotores y potenciadores. Los promotores se encuentran típicamente posicionados en posición 5' con respecto al sitio de iniciación de la transcripción o traducción. Los potenciadores son capaces de influenciar la expresión de genes cuando se encuentran en posición 5' o 3' con respecto al ADNc o cuando se encuentran formando parte de un intrón. Secuencias reguladoras incluyen, además de promotores, secuencias que facilitan la traducción, señales de procesamiento para los intrones, codones de terminación, secuencias señales, sitios internos de unión al ribosoma (IRES) y señales de poliadenilación.

30

El vector de expresión del apartado a) que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 o la construcción génica del apartado a), está operativamente acoplado con una secuencia que regula la expresión de dicha secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 o de dicha construcción génica. El experto en la materia advertirá que el tipo de vector adecuado para

35

la expresión de los ácidos nucleicos y construcciones génicas de la invención, dependerá del organismo en el que se desee expresar el polinucleótido de la invención.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el vector de expresión es el vector prelinearizado pEcoli-Cterm 6xHN Linear.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la clonación de la proteína se realiza en baculovirus y/o los vectores usados se seleccionan, aunque sin limitarnos, de la lista que consiste en: pAcP(+)|E1-1, pAcP(+)|E1-2, pAcP(+)|E1-3, pAcP(+)|E1-4,
 10 pAcP(+)|E1-5, pAcP(+)|E1-6, pAcUW31, pBAC-1, pBAC-2cp, pBAC-3, pBAC4x-1, pBAC-7, pBAC-8, pBAC-9, pBAC-10, pBacPAK8, pBacPAK9, pBACsurf-1, pBlueBac4.5, pBlueBacHis2, pFastBac1, pFastBac HT, pFastBac DUAL, pMbac, pMelBac, pPbac, pTriEx-1, pVL1392 y pVL1393. Preferiblemente, los promotores usados en estos vectores son: el promotor ie1 en el caso de pAcP(+)|E1-1, pAcP(+)|E1-2, pAcP(+)|E1-3, pAcP(+)|E1-4,
 15 pAcP(+)|E1-5, pAcP(+)|E1-6; promotor polh en el caso de pAcUW31, pBAC-1, pBAC-2cp, pBAC-3, pBAC4x-1, pBAC-7, pBAC-8, pBAC-9, pBAC-10, pBacPAK8, pBacPAK9, pBACsurf-1, pBlueBac4.5, pBlueBacHis2, pFastBac1, pFastBac HT, pFastBac DUAL, pMbac, pMelBac, pPbac, pVL1392 y pVL1393; el promotor p10 pAcUW31, pBAC4x-1, pFastBac DUAL, pMbac, pMelBac, pPbac y pTriEx-1. Preferiblemente, la selección de los
 20 clones se efectúa mediante genes de resistencia a antibióticos introducidos en el vector, más preferiblemente de resistencia a ampicilina y/o gentamicina.

Una célula o un organismo hospedador puede comprender la construcción génica o un vector, tal como se han definido en la invención. En principio, cualquier tipo de organismo
 25 hospedador conocido para el experto en la materia puede ser usado en la presente invención, tales como una cepa bacteriana (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y similares), una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y similares), una planta transgénica (dicotiledoneas o monocotiledoneas), una célula de insecto, por ejemplo, baculovirus, una célula de mamífero
 30 (células COS, CHO, C127, HeLa y similares) y un transgénico no humano (por ejemplo, un ratón, una vaca, una cabra, un conejo, un cerdo, etc.).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el hospedador del paso (b) son bacterias de expresión. Más preferiblemente las bacterias de expresión son BL21(DE3). Las
 35 bacterias de expresión BL21(DE2) son células de *Escherichia coli* químicamente competentes, que posee un genotipo adecuado para la transformación y la expresión de

proteínas, y cuyo genoma se conoce (Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). Jeong H, *et al. J. Mol. Biol.* 2009 Dec 11).

5 Una bacteria competente, se caracteriza por tener una pared bacteriana debilitada y por tanto tiene más facilidad para captar un ADN foráneo mediante un proceso de choque térmico o eléctrico (transformación). Para la producción de la proteína se utilizan bacterias de expresión. En esta memoria, las bacterias de expresión son aquellas que poseen la maquinaria necesaria para sobreexpresar el cDNA insertado y producir la proteína recombinante.

10

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la integración de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 del paso (a) se realiza mediante un proceso de ligación.

15 Para la realización del proceso de ligación, la mezcla de inserto: plásmido fue resuspendida en el producto In-Fusion Dry-Down pellet (Clontech). In-Fusion Dry-Down pellet es un liofilizado que contiene la enzima In-Fusion, la cual favorece la unión del inserto al plásmido gracias a la homología en la secuencia nucleotídica presente en ambos.

20 Por tanto, en otra realización preferida de la invención, en la ligación se emplea un liofilizado que comprende la enzima In-Fusion. Ésta es una ADN polimerasa de Poxvirus con actividad exonucleasa 3'-5', que es capaz de unir moléculas de ADN de cadena simple que presentan secuencias cortas y homólogas en sus extremos, tales como un producto de PCR amplificado y un vector.

25 En otra realización preferida, el inserto se sintetizó empleando los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

Otro aspecto se refiere al uso de una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, o a la proteína recombinante de la invención (IFNAR2 soluble, sIFNAR2 o 30 IFNAR2.3), obtenida por otros medios no recombinantes, para su uso en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral; o, alternativamente, al uso de una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 o a la proteína recombinante de la invención, o la proteína de la invención (IFNAR2 soluble, sIFNAR2 o IFNAR2.3) obtenida por otros medios no recombinantes, en la elaboración de un 35 medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral. Es preferible que la proteína de la invención (IFNAR2 soluble, sIFNAR2 o IFNAR2.3) sea

recombinante, y aún más preferiblemente que se obtenga por el método descrito en la presente invención, ya que los métodos de obtención y purificación descritos son ventajosos, se puede obtener por cualquier método conocido en el estado de la técnica para la obtención de proteínas.

5

El término “enfermedad viral” se refiere a la manifestación clínica de una infección viral. Una infección viral se refiere a la contaminación, respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedador, causada por un virus, es decir, que existe invasión con lesión celular o tisular provocada por dichos virus o sus productos. La infección puede ser local o sistémica.

10

El término “virus” se refiere a un agente infeccioso microscópico acelular que sólo tiene la capacidad de multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

Los virus se clasifican en distintos grupos:

15

- Grupo I: virus de ADN bicatenario.
- Grupo II: virus de ADN monocatenario.
- Grupo III: virus de ARN bicatenario.
- Grupo IV: virus de ARN monocatenario positivo.
- Grupo V: virus de ARN monocatenario negativo.
- Grupo VI: virus de ARN monocatenario retrotranscrito.
- Grupo VII: virus de ADN bicatenario retrotranscrito.

20

La enfermedades virales que pueden ser prevenidas, controladas, tratadas y/o aliviadas con la proteína recombinante de la invención se seleccionan preferiblemente, aunque sin limitarnos, de la lista que comprende: virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE), virus de la hepatitis F o G (VHG), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus de la encefalomiocarditis, virus de la estomatitis vesicular o cualquiera de sus combinaciones.

30

El VHA es un virus del Grupo IV que pertenece a la familia *Picomaviridae* y al género *Hepatovirus*. El VHB es un virus del Grupo VII que pertenece a la familia *Hepadnaviridae* y al género *Orthohepadnavirus*. El VHC es un virus del Grupo IV que pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Hepacivirus*. El VHD es un virus del Grupo V que pertenece a la familia *Deltaviridae* y al género *Deltavirus*. El VHE es un virus del Grupo IV que pertenece a

35

la familia Hepeviridae. El VHF es un virus de ADN monocatenario. El VHG es un virus de ARN también conocido como "GB virus C" o "GBVC".

El VIH es virus del Grupo VI que pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*.

5 Existen dos especies de este virus: VIH Tipo 1 y VIH Tipo 2.

El virus sinticial respiratorio (VSR) es un virus de cadena simple de ARN en sentido negativo de la familia *Paramixovirus (Paramyxoviridae)*, la cual incluye virus respiratorios comunes como los que causan sarampión y parotiditis. El VSR es miembro de la subfamilia de
10 *Pneumovirus*.

El virus de la gripe es un virus del Grupo V de la familia *Orthomyxoviridae*. Existen distintos géneros de virus que producen gripe: *InfluenzavirusA*, *InfluenzavirusB* y *InfluenzavirusC*.

15 El virus de la encefalomiocarditis es un virus de ARN perteneciente al género *Cardiovirus* de la familia. Pertenecen a la misma familia los enterovirus, rinovirus, aftovirus y hepatovirus.

El virus de la estomatitis vesicular es un virus del Grupo V perteneciente a la familia
20 *Rhabdoviridae* y al género *Vesiculovirus*. Existen dos serotipos del virus de la estomatitis vesicular que se dividen en distintos subtipos.

USOS DE LOS ANTICUERPOS Y COMPOSICIONES DE LA INVENCION.

25

Tal y como se demuestra en los ejemplos de la invención, la proteína recombinante de la invención, y/o la proteína sIFNAR2, pueden emplearse para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral. Además, el uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la proteína recombinante de la invención son
30 también un objeto de la presente invención. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden obtener fácilmente a partir de antisueros.

Los antisueros para la proteína recombinante descrita en la presente invención pueden ser generados por técnicas estándar, por ejemplo, por inyección de la proteína recombinante de
35 la invención en un animal apropiado y recogida y purificación de los antisueros de los animales. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a la SEQ ID NO: 2, o

una secuencia variante de la misma de acuerdo con la invención pueden ser identificados por inmunoensayos estándar. Los anticuerpos así obtenidos (en lo sucesivo, anticuerpos de la invención) se pueden usar para el método de diagnóstico de la invención. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos son anticuerpos monoclonales.

5

Así pues, en otro aspecto la invención se refiere al uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce específicamente la proteína recombinante de la invención, de ahora en adelante anticuerpo de la invención, para su uso como medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral; o, alternativamente, al uso de de un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce específicamente la proteína recombinante de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral. Anticuerpos contemplados en el contexto de la presente invención incluyen antiseros policlonales, moléculas de IgG purificadas, sobrenadantes o líquido ascítico que contiene anticuerpos monoclonales, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, ScFvdiabodies, triabodies, tetrabodies y anticuerpos humanizados.

10
15

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

20

- a) una proteína que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2,
- b) la proteína recombinante de la invención,
- c) la proteína de la invención (IFNAR2 soluble, sIFNAR2 o IFNAR2.3) obtenida por otros medios no recombinantes, y/o
- d) el anticuerpo, o un fragmento del mismo, de la invención,

25

en la elaboración de un medicamento para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

Dicha composición puede ser una composición farmacéutica. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, de ahora en adelante composiciones farmacéuticas de la invención, que comprenden al menos uno de los polinucleótidos de la invención, polipéptidos de la invención o su forma madura, un anticuerpo de la invención, o un fragmento del mismo, la proteína recombinante de la invención, la proteína de la invención (IFNAR2 soluble, sIFNAR2 o IFNAR2.3) obtenida por otros medios no recombinantes, y/o acompañado de un excipiente farmacéuticamente aceptable. Para uso en medicina, los compuestos y combinaciones de compuestos de la invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista

30
35

farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas, proteínas y otros. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (p.ej., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (p.ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), pero sin limitarnos. En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal.

10

Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" se refieren a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluyen, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la presente invención son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

15

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del individuo al que se administre. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos compuestos y de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

20

25

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende otro principio activo. Preferiblemente, el principio activo se selecciona de la lista que consiste en otros antivirales, analgésicos, antipiréticos, descongestivos u otros principios activos utilizados en el tratamiento de enfermedades víricas.

30

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo o agente terapéutico. Dicho agente terapéutico se selecciona, preferiblemente, de entre un agente analgésico (en el tratamiento de la inflamación y del dolor) o un agente antiinfeccioso (en la prevención de infección).

35

En particular, ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos de utilidad de acuerdo a la invención incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, como los medicamentos anti-inflamatorios no esteroides, agonistas opiáceos y salicilatos; agentes anti-infecciosos, tales como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos, cefalosporinas, antibióticos macrólidos, diversos antibióticos beta-lactámicos, penicilinas, antibióticos quinolonas, antibióticos sulfonamidas, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosos, antiprotozoarios, antiprotozoarios antimaláricos, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, escabicidas, agentes anti-inflamatorios, corticosteroides antiinflamatorios, antipruriginosos/anestésicos tópicos locales, antiinfecciosos, antimicóticos tópicos antiinfecciosos, antivirales tópicos antiinfecciosos, agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos, diuréticos de asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos de tiazida, suplementos de electrolitos, y agentes uricosúricos, enzimas, tales como enzimas pancreáticas y las enzimas trombolíticos, agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, antieméticos, gastrointestinales agentes anti-inflamatorios gastrointestinales, el salicilato de agentes anti-inflamatorios, antiácidos anti-úlceras gástricas, agentes inhibidores de la bomba de ácido antiulcerosos agentes, mucosa gástrica antiulcerosos agentes bloqueantes H₂, antiulcerosos, agentes colestílicos digestants, eméticos, laxantes y ablandadores de heces y agentes procinéticos, anestésicos generales como los anestésicos inhalatorios halogenados anestésicos inhalatorios, anestésicos intravenosos, barbitúricos, benzodiazepinas anestésicos intravenosos anestésicos por vía intravenosa de opiáceos y anestésicos intravenosos agonistas, hormonas y modificadores hormonales, como abortivos, agentes corticosteroides suprarrenales, agentes suprarrenales, los andrógenos, antiandrógenos, inmunobiológicos agentes, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides, y vacunas; anestésicos locales, tales como amida de los anestésicos locales y de los anestésicos locales de tipo éster, agentes musculoesqueléticos, tales como anti-gota agentes antiinflamatorios, corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, compuestos de oro anti-inflamatoria agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), agentes anti-inflamatorios salicilato, minerales y vitaminas, como la vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

En una realización particular, los agentes terapéuticos útiles según las categorías anteriores incluyen: (1) analgésicos en general, tales como lidocaína o sus derivados, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) analgésicos, incluyendo diclofenaco, ibuprofeno,

ketoprofeno, naproxeno y, (2) analgésicos opiáceos agonistas, como la codeína, fentanilo, hidromorfona y la morfina, (3) analgésicos de salicilato, como la aspirina (ASA), (4) bloqueadores H1 antihistamínicos, tales como terfenadina, clemastina y (5) agentes anti-infecciosos, tales como mupirocina; (6) antianaeróbicos anti-infecciosos, tales como cloranfenicol y clindamicina; (7) antifúngicos antibióticos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, fluconazol y ketoconazol; (8) contra el antibiótico macrólido - infecciosos, tales como la azitromicina y eritromicina; (9) diversos beta-lactámico antiinfecciosos, tales como aztreonam y imipenem; (10) antibiótico de penicilina antiinfecciosos, tales como nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y; (11) quinolona antibióticos antiinfecciosos, tales como ciprofloxacina y norfloxacina; (12) antibiótico tetraciclina antiinfecciosos, tales como doxiciclina, minociclina y tetraciclina; (13) antituberculosos antimicobacterianos antiinfecciosos, tales como isoniazida (INH), rifampicina y; (14) antiprotozoarios antiinfecciosos, como atovacuona y dapsona; (15) antipalúdicos antiprotozoarios antiinfecciosos, tales como cloroquina y pirimetamina; (16) anti-retrovirales antiinfecciosos, tales como ritonavir y zidovudina; (17) contra el antiviral - infeccioso agentes, tales como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa, y rimantadina; (18) antifúngicos tópicos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, miconazol, nistatina y; (19) antivirales tópicos antiinfecciosos, tales como el aciclovir; (20) agentes electrolíticas y renales, como la lactulosa; (21) diuréticos de asa, como la furosemida, (22) diuréticos ahorradores de potasio, como triamtereno; (23) diuréticos tiazídicos, tales como hidroclorotiazida (HCTZ), (24) agentes uricosúricos, tales como probenecid; (25) enzimas, tales como RNasa y DNasa; (26) antieméticos, tales como proclorperazina; (27) salicilato gastrointestinales inflamatorias anti-agentes, tales como sulfasalazina; (28) de la bomba gástrica de ácido anti-inhibidor agentes de úlceras, tales como el omeprazol; (29) bloqueantes H2, agentes anti-úlceras, tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; (30) digestivos, tales como pancrelipase; (31) agentes procinéticos, tales como la eritromicina (32; éster) anestésicos locales, tales como benzocaína y procaína; (33) musculoesqueléticos corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, tales como beclometasona, betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, y prednisona; (34) musculoesqueléticos antiinflamatorios inmunosupresores, tales como azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato; (35) musculoesqueléticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorlac, y naproxeno; (36) minerales, tales como hierro, calcio y magnesio; (37) Los compuestos de vitamina B , tales como la cianocobalamina (vitamina B12) y la niacina (vitamina B3); (38) compuestos de vitamina C, tales como ácido ascórbico, y (39) compuestos de vitamina D, tales como calcitriol.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

10

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad viral es generada por un virus que se selecciona de la lista que consiste en: virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE), virus de la hepatitis F o G (VHG), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus de la encefalomiocarditis, virus de la estomatitis vesicular o cualquiera de sus combinaciones.

15

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades o prevención de estados fisiológicos no deseados en el hombre y los animales.

20

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

25

Los interferones tipo I (alpha, beta and omega), ejercen su acción a través de la interacción con el receptor de membrana IFNAR, formado por dos subunidades IFNAR1 e IFNAR2. La subunidad IFNAR2 del receptor sufre un procesamiento alternativo del ARNm que da lugar a tres formas distintas: una forma corta (IFNAR2b), una forma larga funcionalmente activa (IFNAR2c) y la forma soluble (sIFNAR2, IFNAR2.3 o IFNAR2a). Solamente IFNAR2c actúa como receptor funcional junto con IFNAR1 y es capaz de mediar los efectos biológicos del IFN β , a través de la activación de la cascada de señalización JAK-STAT.

30

35

Múltiples variantes de la transcripción que codificaban por lo menos dos isoformas diferentes se han encontrado para este gen. La secuencia aminoacídica de sIFNAR2 se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) L41943.1 y en la SEQ ID NO: 2. Dicha SEQ ID NO: 2 está representada por la siguiente secuencia aminoacídica:

5
 MLLSQNAFIFRSLNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTH
 YTLTYTIMSKPEDLKVVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNTTLFSCSHNF
 WLAIMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEEELQFDLSLVIEEQSEGIVKHKHPEIKGNMS
 GNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQSEFS.

10
 En el contexto de la presente invención, sIFNAR2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

20
 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IFNAR2.3. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del
 25 GenBank (NCBI) L41943.1 y la SEQ ID NO: 1. Dicha SEQ ID NO: 1 está representada por la siguiente secuencia nucleotídica:

30
 agatgtaaaagtcaagagaagactctaaaaatagcaaagatgcttttgagccagaatgcctcatcttcagatcacttaattggttc
 tcatgggtatatacagcctcgtgtttggtatttcatatgattgcctgattacacagatgaattctgcactttcaagatatcattgcgaaatt
 tccggtccatcttatcatgggaattaaaccactccattgtaccaactactatacattgctgtatacaatcatgagtaaaccaga
 agatttgaagggtgtaagaactgtgcaaataccacaagatcattttgtgacctcacagatgagtgaggagaagcacacagaggc
 ctatgtcaccgtcctagaaggattcagcgggaacacaacggtgttcagttgctcacacaatttctggctggccatagacatgtctttg
 aaccaccagagttgagattgtgttttaccacacattaatgtgatgggtgaaatttccatctattgttgaggaagaattacagttg
 atttatctctcgtcattgaagaacagtcagaggggaattgtaagaagcataaaccgaaataaaaggaaacatgagtggaattt
 35 cacctatatcattgacaagttaattccaaacacgaactactgtgatctgtttatttagagcacagtgatgagcaagcagtaataaag
 tctcccttaaaatgcaccctcctccactggccaggaatcagaatttcataacttttagcctggccatttctaacctgccaccggtg

EJEMPLOS DE LA INVENCION

5 **Ejemplo 1: Evaluación de la capacidad antiviral de sIFNAR2 recombinante por el test del efecto citopático o Bioensayo.**

Es la técnica recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para evaluar capacidad antiviral y para la detección de anticuerpos frente a IFN β . Esta técnica está basada en la capacidad antiviral del IFN β , de forma que un cultivo celular (línea A549), cuando es infectado con un virus específico (virus de la encefalomiocarditis), queda protegido por la presencia de IFN β , a no ser que estén presentes anticuerpos neutralizantes en el suero del paciente que bloqueen la acción de dicho IFN β .

15 Hemos realizado una serie de bioensayos en presencia de sIFNAR2 recombinante que nos ha permitido comprobar que nuestra sIFNAR2 recombinante presenta una capacidad antiviral importante permaneciendo las células vivas, actuando de forma similar al IFN β .

20 La figura 1 ilustra un bioensayo representativo realizado en presencia de sIFNAR2. Mayor intensidad en el color violeta, se corresponde con una mayor supervivencia celular tras la infección del cultivo celular con el virus de la encefalomiocarditis (EMC). Los distintos escenarios de experimentación que contempla la figura 1 son los siguientes:

- 25 • Columnas 1,2: Estándar de IFN β . Se comienza por una concentración de 20UI de IFN β y se van realizando diluciones seriadas. Al ir disminuyendo la concentración, se observa una degradación de color porque las células están menos protegidas por la acción del IFN β .
- 30 • Columnas 3,4: Se añade IFN β diluyendo desde 20UI y una concentración constante de 30 ug/ml de sIFNAR2 a lo largo de toda la columna. Las células permanecen vivas en todas las diluciones, no observándose degradación de color en ninguno de los pocillos. A medida que el IFN β deja de proteger porque se va diluyendo, sIFNAR2. continua protegiendo las células del virus.
- 35 • Columnas 5-6 superior: 8 replicas añadiendo sIFNAR2 60ug/ml. Se puede observar que las células quedan vivas, estando protegidas respecto al CV.

- Columnas 5-6 inferior: 8 replicas añadiendo sIFNAR2 30ug/ml. Se puede observar que las células quedan vivas, estando protegidas respecto al control viral.
- Columnas 7-8 superior: 8 replicas añadiendo sIFNAR2 15 ug/ml. Se puede observar que las células quedan vivas, estando protegidas respecto al CV.
- 5 • Columnas 9-10: se ha añadido en toda la columna 30ug/ml de sIFNAR2 el tercer día del ensayo, a la vez que se añade el virus, observándose así una mayor capacidad antiviral.
- Columnas 11-12 superior: Control celular (CC): solo células A549;
- Columnas 11-12 inferior: Control Viral (CV): células A549 infectadas con el virus de la encefalomiocarditis, sin protección.

10

La figura 4 consiste en una placa de Bioensayo que muestra la capacidad antiviral de sIFNAR2. Se demuestra que B18R, que es un inhibidor del IFN β , bloquea la acción del IFN β pero no bloquea la acción de la proteína sIFNAR2 recombinante, se observa como las células permanecen protegidas en presencia de B18R+sIFNAR2.

15

- Columnas 1,2: Estándar de IFN β . Se comienza por una concentración de 20UI de IFN β y se van realizando diluciones seriadas. Al ir disminuyendo la concentración, de se observa una degradación de color porque las células están menos protegidas por la acción del IFN β .

20

- Columnas 3,4: Combinación de IFN β /sIFNAR2. Se añade IFN β diluyendo desde 20UI y sIFNAR2 diluyendo desde una concentración de 60 ug/ml. Se observa como la presencia de las dos moléculas aumenta ligeramente la protección respecto a cada una de ellas por separado.

25

- Columnas 5-6: se añade sIFNAR2 60ug/ml en el primer pocillo y se van haciendo diluciones seriadas. Se puede observar que las células quedan vivas en los primeros pocillos y va disminuyendo la viabilidad al ir disminuyendo la concentración de sIFNAR2.

30

- Columnas 7-8 superior: 4 replicas añadiendo sIFNAR2 60 ug/ml y B18R (un potente inhibidor del IFN β) Se puede observar que las células quedan vivas, estando protegidas respecto al CV. El inhibidor de IFN β no inhibe sIFNAR2.

35

- Columnas 9-10 superior: 4 replicas añadiendo IFN β 20U y B18R (un potente inhibidor del IFN β). Se puede observar que las células mueren puesto que B18R inhibe al IFN β .

- Columnas 7-8 inferior: 4 replicas con IFN80 (añadido el mismo día del virus). Se observa protección.

- Columnas 9-10 superior: 4 replicas con IFN40 (añadido el mismo día del virus). Se observa protección.

- Columnas 11-12 superior: Control celular (CC): solo células A549.
- Columnas 11-12 inferior: Control Viral (CV): células A549 infectadas con el virus de la encefalomiocarditis, sin protección.

5 **Ejemplo 2: Producción de la proteína recombinante SIFNAR2**

Elección del vector de clonación

10 El sistema de expresión procariota escogido, es el vector prelinearizado pEcoli-Cterm 6xHN Linear (Clontech). La proteína resultante tendrá fusionada una cola histidina-asparagina en el extremo carboxi terminal que servirá para su purificación.

En las figuras se detalla la estructura del vector donde se integró el inserto con la secuencia nucleotídica de nuestra proteína de interés.

15

El sistema de expresión de pEcoli Cterm 6xHN Linear está basado en el sistema de expresión del promotor fuerte T7, controlado por el operón LacZ que a su vez es inducible por IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido). Además, el plásmido posee un gen de resistencia a la ampicilina que permite la selección de los clones que contienen el plásmido.

20

Para la producción de la proteína, se utilizó la maquinaria de las bacterias de expresión BL21 (DE3), que utilizan el promotor T7. Las bacterias BL21 (DE3) contienen una copia cromosomal del gen de la T7 ARN polimerasa, que a su vez está bajo el control del promotor de lacUV5 inducible por IPTG.

25

Síntesis del inserto de ADN

30 El primer punto en el diseño de la estrategia de clonación fue la síntesis del inserto. Para ello se recabó toda la información sobre la secuencia de SIFNAR2, como la secuencia señal del péptido, las modificaciones postraduccionales, las características bioquímicas de la proteína, los dominios de la misma, etc. Toda esta información se obtuvo de la base de datos UNIPROT (<http://www.uniprot.org/uniprot/P48551>), que alberga las secuencias aminoacídicas de las proteínas y sus características bioquímicas.

35 La secuencia del ARNm de SIFNAR2 se obtuvo a partir de la base de datos NUCLEOTIDE del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>.)

Siguiendo las directrices del fabricante, los cebadores debían de cumplir los siguientes requisitos:

El extremo 5´:

- 5 • Contener 15 bases homólogas con las 15 bases del final del fragmento de ADN del vector donde va a ser insertado.

El extremo 3´:

- Poseer 15 bases homólogas con los extremos del gen que va a ser insertado.
- Una longitud entre 18-25 pb y un contenido de GC del 40-60%.
- 10 • Ausencia del codón de inicio (ATG) y de parada en la secuencia a amplificar.
- Ausencia de la secuencia señal.

Teniendo en cuenta estas premisas, los cebadores daban un producto tras la amplificación de 638 pb. Las secuencias de los cebadores fueron:

15

Sentido (secuencia SEQ ID NO. 3):

5´TAAGGCCTCTGTCGACATTTTCATATGATTTCGCCTGATTACACGATG 3´

Antisentido (secuencia SEQ ID NO. 4):

20 5´CAGAATTCGCAAGCTTTGAAAATTCTGATTCCTGGCCAGGTGGAA 3´

El inserto se sintetizó mediante PCR convencional a partir de los cebadores diseñados en el punto anterior, empleando una Taq de alta fidelidad y utilizando como molde un ADNc proveniente de una mezcla de ADNc humano comercial. Las condiciones óptimas de concentraciones, temperatura y tiempos para la síntesis del inserto fueron las siguientes:

25

Tabla 1. Resumen de los reactivos de la PCR convencional para la síntesis del inserto.

Reactivos	Volumen/ muestra	Concentración final/ muestra
Agua libre de Rnasas	40 µl	
Cebador sentido (20 µM)	1 µl	0,4 µM
Cebador antisentido (20 µM)	1 µl	0,4 µM
Dntp (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Tampón 5X	5 µl	1X
Pfu High Fidelity	1 µl	

cDNA	1 µl	
------	------	--

Condiciones de temperatura:

5 Tabla 2. Resumen de las condiciones de temperatura para la síntesis del inserto mediante PCR convencional.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	20 seg	40 ciclos
Anillamiento	60,4°C	20 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1
Etapa final	4°C	Infinito	

10 El producto final obtenido de la PCR, fue separado en función de su tamaño mediante la técnica de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% disuelta en tampón TAE, junto con el intercalante Gold View Nucleic Acid Satín (Sbs Genetech) a una dilución 1/20. El gel fue sometido a una corriente constante de 80 V y fue visionado en un transiluminador de ultravioleta, que permitió localizar la banda de interés en función del número de pares de bases. La banda localizada a la altura de 638 pb fue recortada del gel de agarosa con la ayuda de un bisturí.

15 La secuencia del inserto amplificada contenida en la agarosa, fue purificada con el kit comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Al final del proceso se obtuvo un eluido, que fue cuantificado con un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo) antes de ser almacenado a -20°C.

20 Proceso de ligación

Seguendo el esquema de trabajo, el siguiente punto en el proceso de clonación, fue el proceso de ligación, es decir, “pegar” al plásmido, la secuencia nucleotídica de sIFNAR2, que dará lugar a la proteína recombinante.

25 Para determinar las concentraciones y los volúmenes del inserto y del plásmido, la casa comercial Clontech, en su web ofrece una herramienta informática

(<http://bioinfo.clontech.com/infusion>) para calcular las cantidades óptimas del vector y del inserto, para el proceso de ligación a partir de las variables conocidas longitud del vector y del inserto.

5 Para la realización del proceso de ligación, la mezcla de inserto: plásmido fue resuspendida en el producto In-Fusion Dry-Down pellet (Clontech). In-Fusion Dry-Down pellet es un liofilizado que contiene la enzima In-Fusion, la cual favorece la unión del inserto al plásmido gracias a la homología en la secuencia nucleotídica presente en ambos. La reacción de ligación fue llevada a cabo en un termociclador, a 37°C durante 15 minutos seguida de 15 minutos a 50°C y posteriormente fue transferido a hielo. Finalmente, el producto de ligación
10 fue resuspendido en 40 µl de tampón TE (Tris-HCl, EDTA) a pH 8.

Transformación en bacterias replicativas

15 Las bacterias competentes utilizadas fueron MAX Efficiency DH5α™ Competent Cells (Invitrogen) las cuales fueron transformadas con el plásmido, siguiendo el siguiente protocolo:

Como control positivo de la técnica de transformación, se añadieron 5 µl del plásmido pUC19 (control positivo) en una alícuota de bacterias competentes y se resuspendió suavemente esta mezcla. De forma paralela, se transformaron las bacterias con el producto
20 de ligación. Para ello, se añadieron 2,5 µl a una alícuota de bacterias competentes y se mezcló suavemente. A continuación, ambas alícuotas de bacterias (control y problema) fueron incubadas durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las muestras se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Rápidamente, las muestras fueron transferidas a hielo durante 2 minutos y posteriormente se añadieron 900 µl de medio
25 SOC (el cual favorece el proceso de transformación). Para que el plásmido expresara la resistencia a ampicilina, las muestras fueron incubadas a 37°C, con agitación de 225 rpm durante 1 hora. Finalmente las bacterias transformadas, fueron sembradas a diferentes volúmenes en placas de LB-Agar suplementadas con ampicilina 100 µg/ml e incubadas toda la noche a 37°C.

30

Purificación del ADN plasmídico y verificación del marco de lectura

Trascurrida una noche en el incubador, las bacterias habían formando UFC (unidades formadoras de colonias). Para evaluar las características de cada UFC, éstas fueron
35 aisladas de forma independiente con la ayuda de un hilo de siembra y sembradas en tubos con 4 ml de medio LB Broth suplementados con 100 µg/ml de ampicilina. Estas

suspensiones fueron incubadas a 37°C durante toda la noche con una agitación de 220 rpm junto con un control negativo que fue un tubo de LB Broth sin bacterias. Posteriormente, se procedió a la purificación del plásmido contenido en las bacterias, siguiendo las indicaciones del kit de Promega (PureYield™ Plasmid Miniprep System) como se explican a continuación:

5

El cultivo de bacterias fue alicuotado en tubos de 1.5 ml y centrifugado a 16000g durante 30 segundos en una microcentrifuga. Del producto obtenido, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 600 µl de agua, al cual se le añadió 100µl de tampón de lisis celular y fue mezclado por inversión. A esta mezcla se le añadieron 350µl de solución neutralizante y se mezcló de nuevo por inversión. A continuación, se centrifugó a 16000g durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido a una de las minicolumnas que proporciona el kit que retiene el ADN. Se volvió a centrifugar a 16000g durante 15 segundos. A continuación, se le añadieron 200µl de solución de lavado a la minicolumna y se volvió a centrifugar durante 15 segundos. Posteriormente, se añadieron 400µl de solución de lavado a la minicolumna y se centrifugó durante 30 segundos. Finalmente para eluir el ADN que había quedado retenido en la membrana, se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml, se le añadieron 30µl de agua estéril al centro de la membrana y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, para obtener el ADN plasmídico purificado se centrifugó a 16000g durante 15 segundos. El ADN plasmídico fue cuantificado mediante absorbancia en el espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo) y fue almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

20

En este punto teníamos diferentes UFC aisladas y congeladas, pero se desconocía si el plásmido poseía el inserto, su secuencia completa, la orientación en el marco abierto de lectura etc., por tanto se debía comprobar que el plásmido cumplía con todos los requisitos deseados. Para ello se realizaron dos pruebas:

25

- PCR convencional utilizando como ADN molde el ADN plasmídico.
- Secuenciación de ADN: Los plásmidos positivos en la PCR, fueron secuenciados para obtener la secuencia nucleotídica que nos permitiría evaluar la secuencia del inserto y comprobar la orientación del mismo.

30

La secuenciación del inserto abarcaba secuencias aguas arriba que coincidían con el promotor del T7 y aguas abajo con la secuencia T7 terminal. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en sentido 5'3' con la secuencia de referencia del NCBI de número de *GeneBank*: CAA61940.1 mediante el programa bioinformático Multalin. A continuación se

35

muestra los resultados obtenidos tras el alineamiento que nos cercioraba la integridad de la secuencia y orientación en el marco de lectura correcto:

Transformación en bacterias de expresión BL21 (DE3)

5

Una vez verificado el clon que contenía el plásmido con las condiciones correctas, el plásmido se transformó en las bacterias de expresión BL21(DE3) para la producción de la proteína recombinante sIFNAR2, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para la transformación en bacterias replicativas y detección del plásmido.

10

Inducción de la expresión de la proteína recombinante sIFNAR2

En condiciones normales, en las bacterias BL21 (DE3) transformadas con el plásmido, la proteína recombinante no se está expresando porque su expresión está reprimida por el represor Lac (LacI) que se encuentra unido al operon Lac. Para permitir su expresión, es necesario la adición de IPTG que actúa como inductor secuestrando al represor y permitiendo que la T7 ARN polimerasa se una al promotor T7 y realice el proceso de transcripción. Para inducir la expresión de la proteína recombinante sIFNAR2 se siguió el siguiente protocolo:

15

20

En el día previo a la inducción de la producción de la proteína, se preparó un precultivo de la siguiente manera:

- Las bacterias BL21 (DE3) con el plásmido fueron cultivadas en 4ml de LB-Broth suplementados con ampicilina a una concentración final de 100µg/ml e incubadas toda la noche a 37°C con una agitación de 220 rpm.

25

- Al día siguiente, se realizó la inducción de la expresión de la proteína. Para ello, el cultivo del día anterior fue diluido 1/10 en un volumen final de 50 ml de medio LB-Broth suplementado con ampicilina e incubado a 37°C con una agitación de 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.80-1 nm. Llegado este momento se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 0.5mM (previamente establecida) y el cultivo fue incubado durante 4 horas a 37°C con una agitación de 220 rpm. A partir de este momento comenzó el proceso de transcripción para la expresión de la proteína. Transcurridas las 4 horas de inducción (optimizada previamente) se recogió el cultivo y se centrifugó a 1600g a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet guardado a -80°C hasta su posterior uso.

30

35 Extracción de la proteína recombinante

La proteína recombinante expresada se localizaba en el interior de la bacteria. Para acceder a ella y poder purificarla se debía romper la pared bacteriana mediante procesos físicos y químicos que a continuación se detallan:

- 5 El precipitado de bacterias almacenado a -80°C fue descongelado a temperatura ambiente. Seguidamente, se le añadieron 0.5ml de tampón de lisis bacteriana por cada mililitro de cultivo inicial y se resuspendió con la ayuda de una pipeta. La suspensión resultante fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Transcurrido este tiempo la muestra fue sometida a ultrasonidos en ciclos de 5 pulsos de 30 segundos en hielo, y con
10 una intensidad del 40%. A continuación fue ultracentrifugada a 15000 g durante 20 minutos a 4°C y con ello se separaron las membranas de las proteínas liberadas de la bacteria. Tras la ultracentrifugación se recogió el sobrenadante y se pasó a través de un filtro de 0.45 µm.

Purificación de la proteína recombinante sIFNAR2

- 15 El producto obtenido tras la extracción contenía la proteína recombinante junto con otras proteínas bacterianas. Para purificar y aislar la proteína recombinante sIFNAR2, se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad, de forma que la proteína recombinante sIFNAR2 queda retenida por la cola de histidina-asparagina que contiene. Las columnas elegidas se
20 presentan en un volumen de 1 ml y están llenas de resina de sefarosa que llevan unidas iones de níquel. Los iones de níquel le confieren la capacidad de retener proteínas ricas en histidina y por tanto la proteína recombinante sIFNAR2 va a quedar retenida, entre otras. La liberación de la proteína de la resina se produce por la adicción de un tampón rico en imidazol que compite con el sitio de unión al níquel. A continuación se detalla el protocolo
25 seguido:

- Antes de iniciar el proceso de purificación con la cromatografía de afinidad, la resina fue lavada y equilibrada con 10 ml de tampón de equilibrado. Seguidamente, el extracto proteico que contiene nuestra proteína de interés, fue puesto en contacto con la resina en rotación a
30 4°C durante 1 hora y posteriormente, la resina fue empaquetada en la columna. Para eliminar las proteínas no unidas a la resina, ésta se lavó con 10ml de tampón de equilibrado. Finalmente, las proteínas retenidas por el níquel fueron eluidas con 5 ml de tampón de elución rico en imidazol y recogidas en alícuotas de 1 ml.

- 35 *Detección de la proteína recombinante: Electroforesis y Western blot*

El primer paso para la detección de la proteína fue la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente la transferencia de las proteínas a una membrana.

El protocolo seguido fue:

5 Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga 5x y hervidas a 100°C durante 3 minutos en un termobloque. A continuación, éstas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12%, sumergida en tampón de electroforesis y sometida a una corriente constante de 130 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel obtenido fue sumergido en tampón de transferencia durante unos minutos.

10 La transferencia se realizó en un sistema semi-seco en planchas de grafito que previamente habían sido humedecidas con agua. A continuación la membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45 μm fue activada sumergiéndola en agua y posteriormente equilibrada en tampón de transferencia. Posteriormente, se procedió a montar el sándwich; sobre la plancha de grafito; se dispusieron 9 papeles de transferencia previamente humedecidos en tampón de transferencia, a continuación la membrana encima y sobre ésta

15 el gel que iba a ser transferido. Para terminar con el sándwich, se volvieron a poner 9 papeles de transferencia humedecidos en tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante 45 minutos con una intensidad de 0,8 mA/cm².

Una vez terminada la transferencia, la membrana fue separada y bloqueada con tampón de bloqueo durante 2h a temperatura ambiente y con agitación. El bloqueo es una etapa que

20 evita la unión no específica de los anticuerpos a los sitios libres de la membrana, quedando éstos bloqueados con la caseína de la leche. Tras el bloqueo, la membrana fue puesta en contacto con el anticuerpo primario anti-IFNAR2 Human producido en conejo (Abnova) 1/5000, previamente establecida la dilución, en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en rotación. Al día siguiente, la membrana fue retirada de la solución con anticuerpo y

25 lavada con tampón de lavado. La membrana fue incubada durante una hora y media con el anticuerpo anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich) marcado con fosfatasa alcalina, a una dilución 1/10000 en solución de bloqueo. Se procedió a lavar como en el punto anterior. Para ver el resultado del western blot, se reveló la membrana poniéndola en contacto con una mezcla formada por 200 μl de NBT/BCIP + 10ml de solución de revelado a temperatura ambiente

30 hasta la aparición un producto coloreado. Para finalizar, la reacción fue parada desechando la solución de revelado y sumergiéndola en solución de parada, rica en iones magnesio que bloquean el desarrollo de la reacción colorimétrica retirando el NBT/BCIP.

Análisis de la proteína recombinante

35

Tras la purificación de la proteína recombinante sIFNAR2, se procedió a su análisis. Para ello, se escindieron las la/s proteínas/bandas de un gel de acrilamida SDS/PAGE y se fragmentaron para realizar el análisis posterior de la huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

5

REIVINDICACIONES

1.- Uso de la proteína sIFNAR2 en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral.

5

2.- El uso de la proteína sIFNAR2 según la reivindicación anterior, donde la secuencia aminoacídica de la proteína sIFNAR2 es la SEQ ID NO. 2, o una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO. 2, y en la que la proteína codificada por dicha secuencia aminoacídica posee la actividad y las características estructurales de la proteína sIFNAR2.

10

3.- El uso de la proteína sIFNAR2 según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la proteína sIFNAR2 es una proteína recombinante.

15

4.- El uso de la proteína sIFNAR2 según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la proteína sIFNAR2 es obtenida por medios no recombinantes.

20

5.- Uso de una composición que comprende la proteína sIFNAR2 según se ha definido esta proteína en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, tratamiento y/o alivio de una enfermedad viral, donde dicha composición es una composición farmacéutica que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

25

6.- El uso de la composición según la reivindicación anterior, que además comprende otro principio activo.

30

7.- El uso de la composición según la reivindicación anterior, donde el principio activo se selecciona de la lista que consiste en otros antivirales, analgésicos, antipiréticos, descongestivos u otros principios activos utilizados en el tratamiento de enfermedades víricas

35

8.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la enfermedad viral es generada por un virus que se selecciona de la lista que consiste en: virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE), virus de la hepatitis F o G (VHG), virus de

la inmunodeficiencia humana (VIH), virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus de la encefalomiocarditis, virus de la estomatitis vesicular o cualquiera de sus combinaciones.

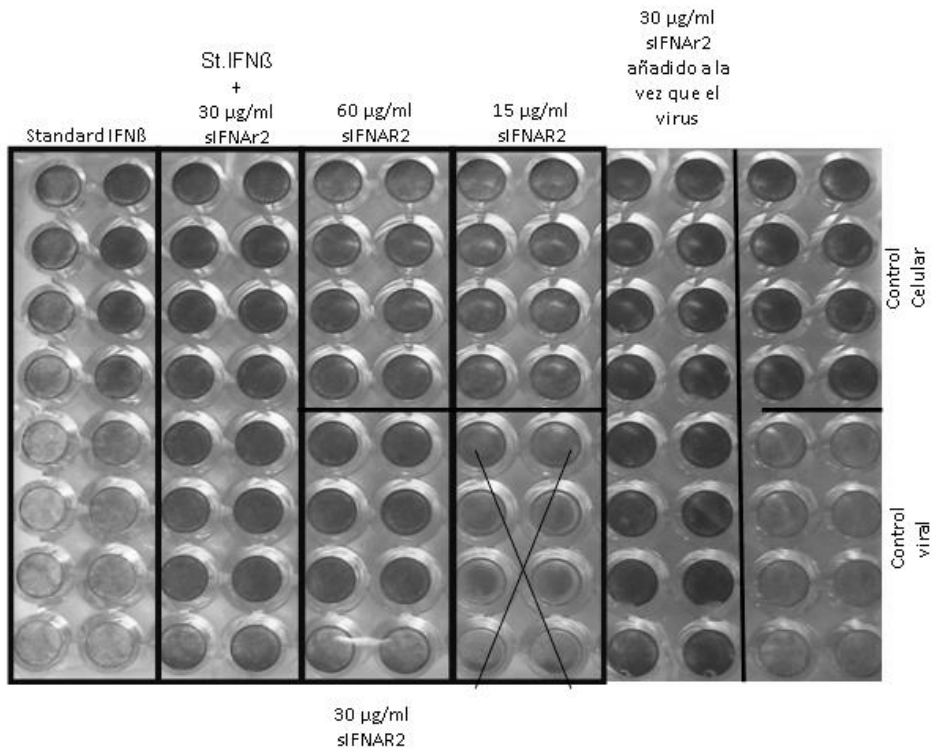


Fig.1

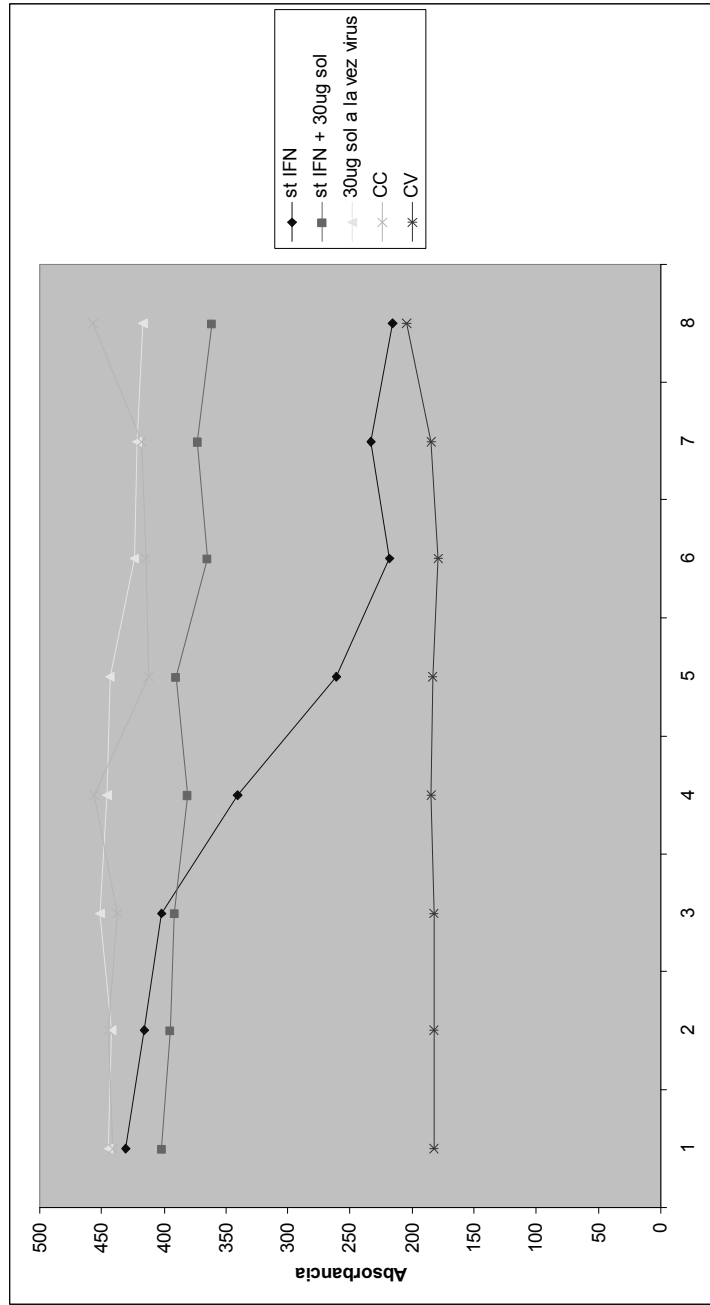


Fig.2

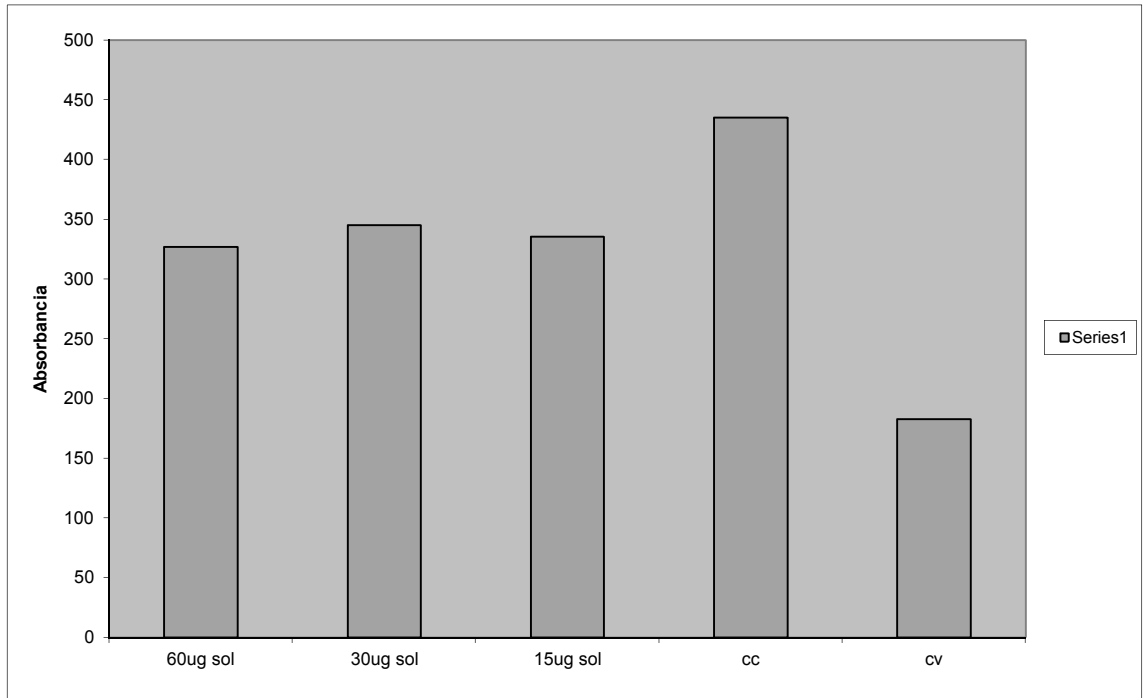


Fig.3

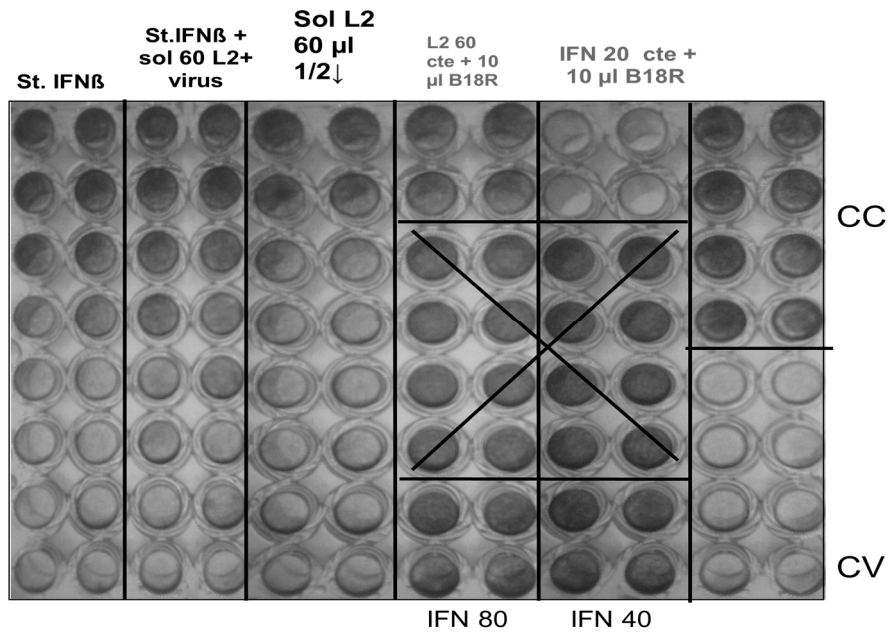


Fig.4

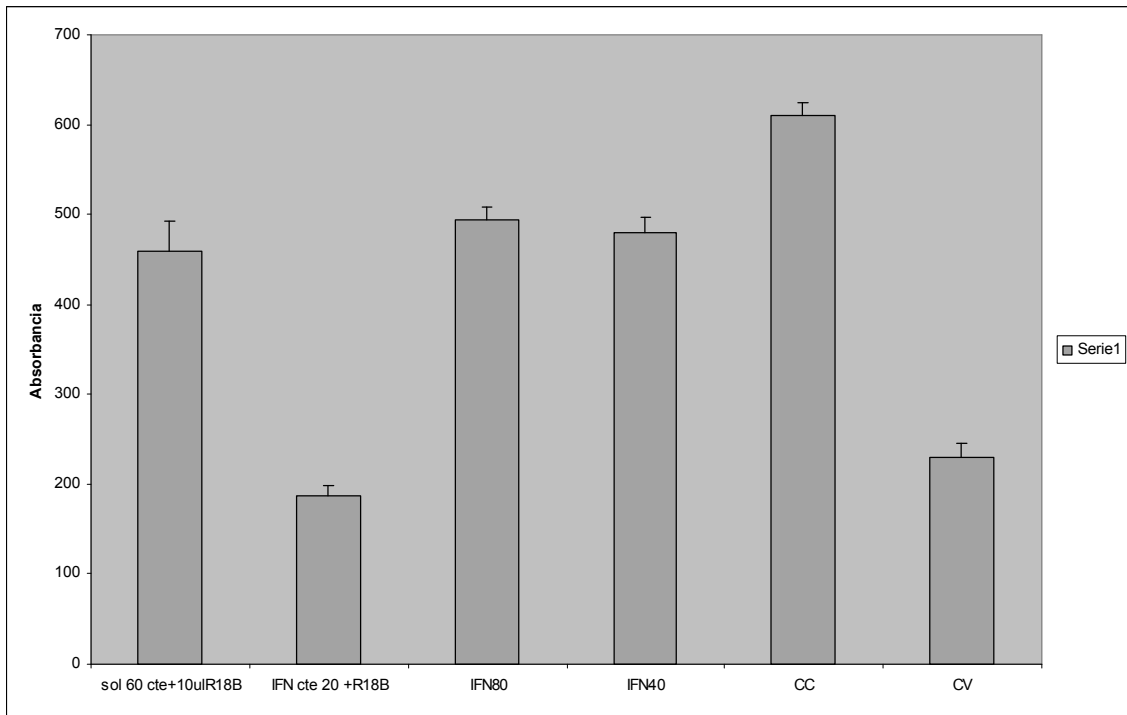


Fig.5

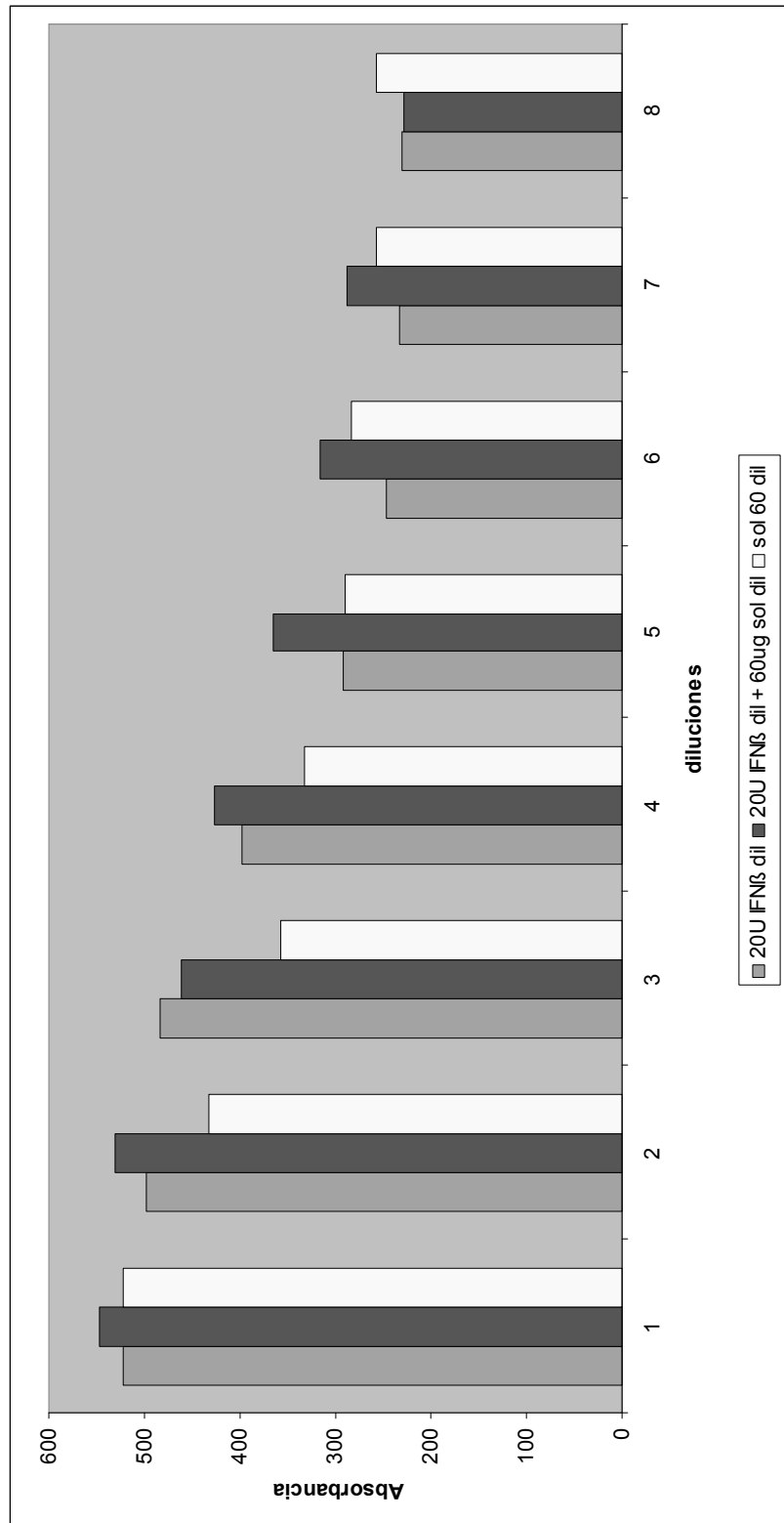


Fig.6

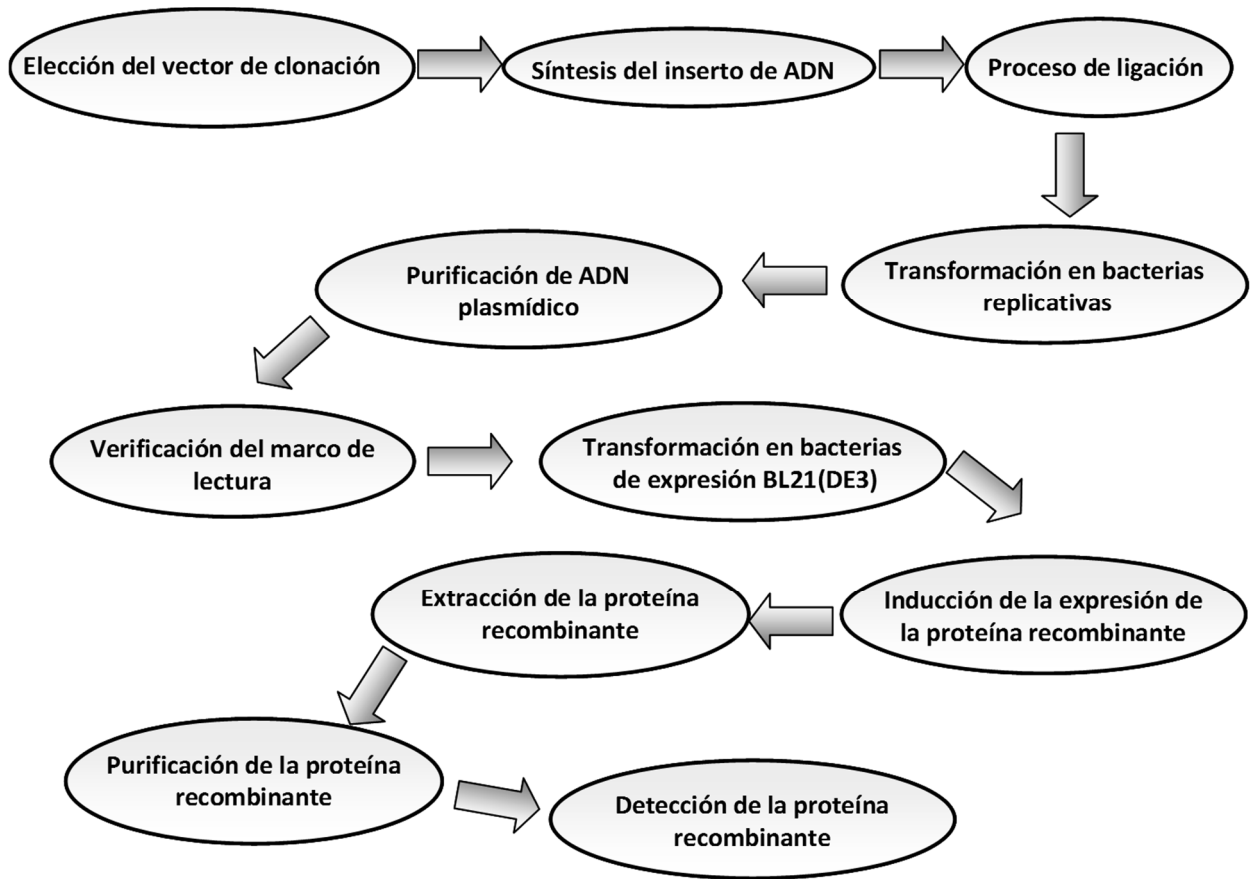


Fig.7

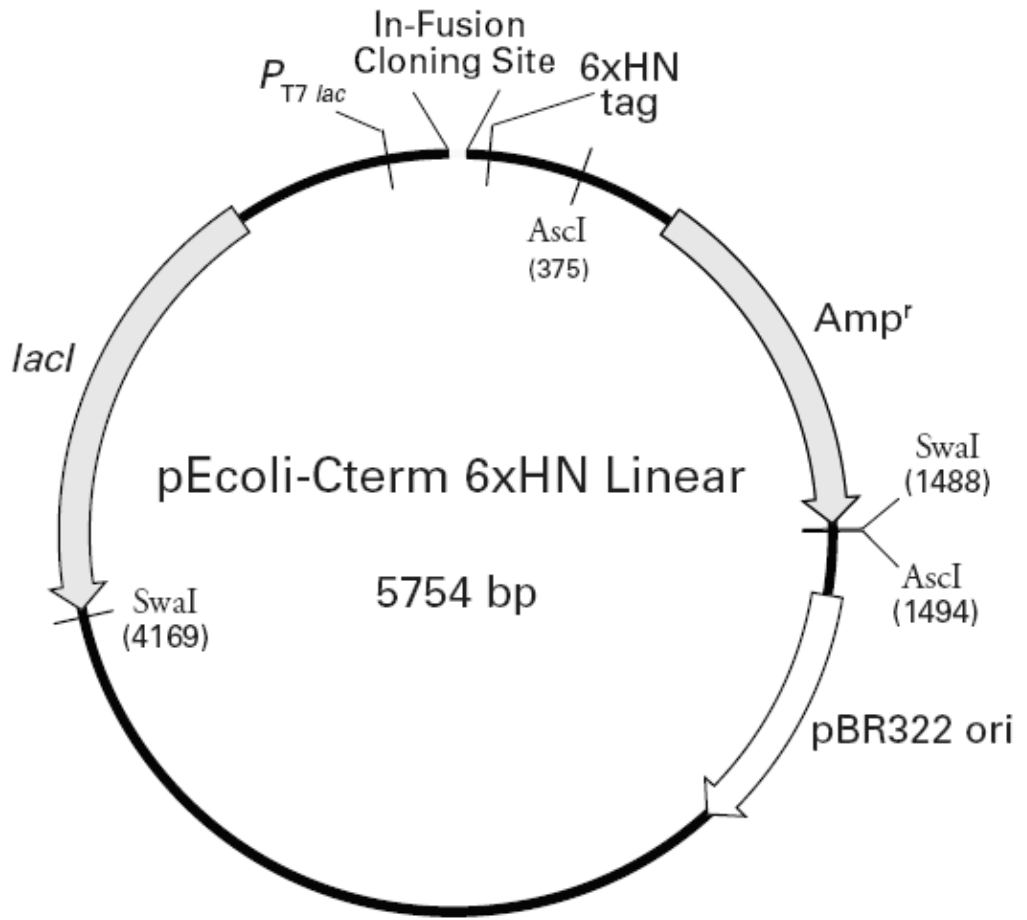


Fig.8

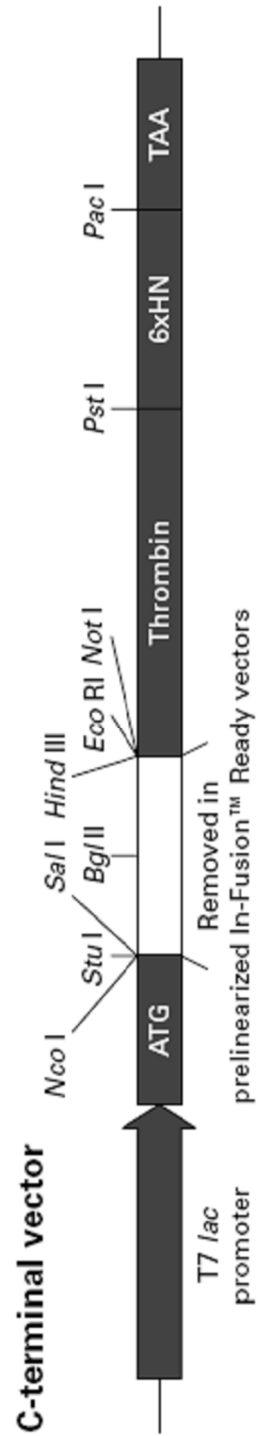


Fig.9

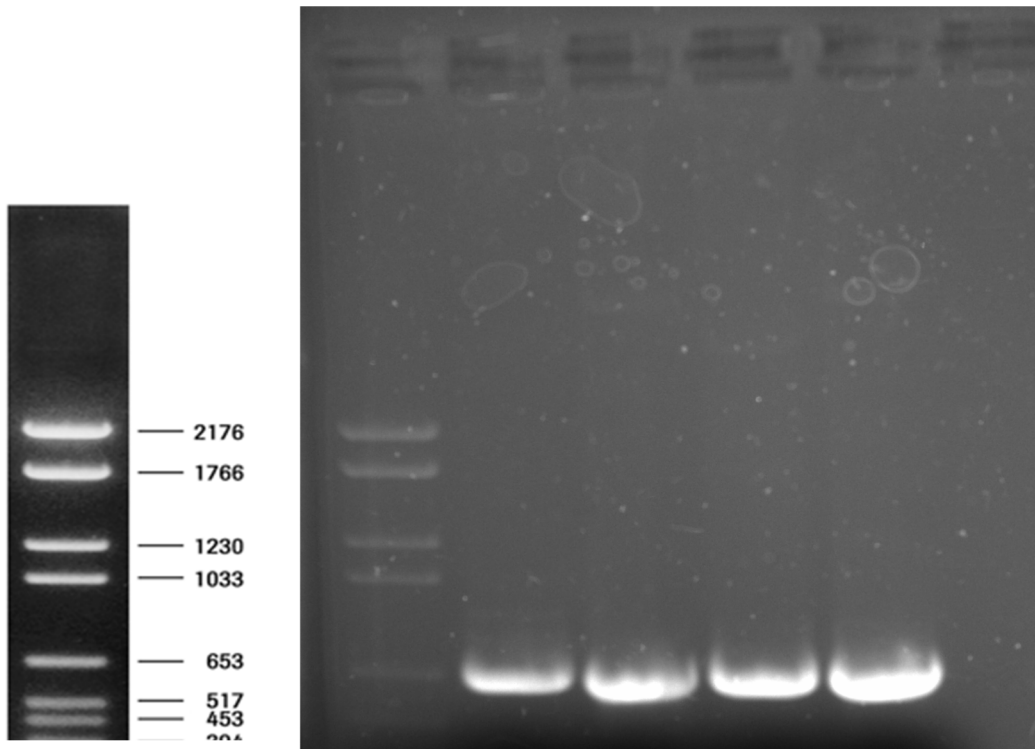


Fig.10

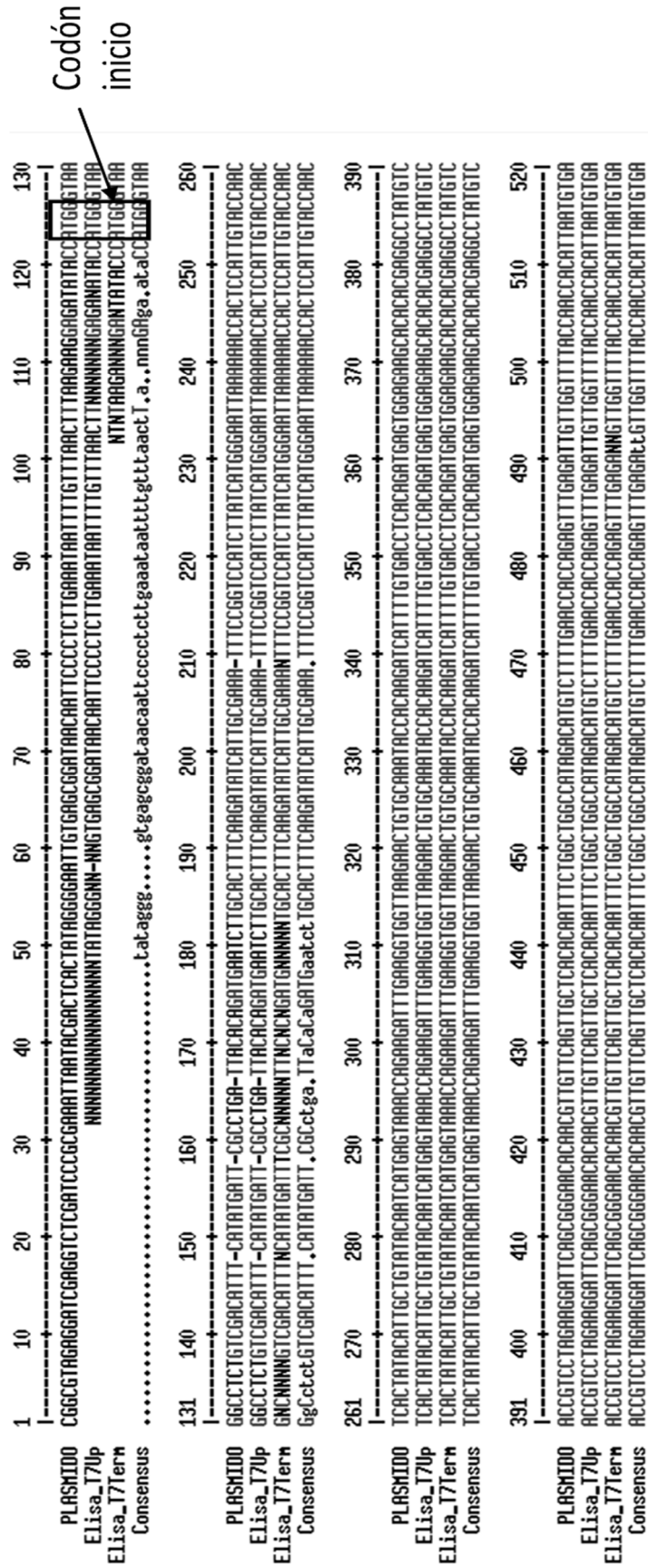


Fig.11

521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
PLASMIDO	TGGTGA	ATTTCC	ATCTATT	GTGGG	AGGAA	TTAC	AGTT	TGAT	TTAT	CTC	TCT	CGT	CA
Elisa_I7Up	TGGTGA	ATTTCC	ATCTATT	GTGGG	AGGAA	TTAC	AGTT	TGAT	TTAT	CTC	TCT	CGT	CA
Elisa_I7Iern	TGGTGA	ATTTCC	ATCTATT	GTGGG	AGGAA	TTAC	AGTT	TGAT	TTAT	CTC	TCT	CGT	CA
Consensus	TGGTGA	ATTTCC	ATCTATT	GTGGG	AGGAA	TTAC	AGTT	TGAT	TTAT	CTC	TCT	CGT	CA
561	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690
PLASMIDO	CTATAT	CATTG	ACAG	TTA	ATCC	AA	CCG	AA	CTA	AA	CC	CG	CA
Elisa_I7Up	CTATAT	CATTG	ACAG	TTA	ATCC	AA	CCG	AA	CTA	AA	CC	CG	CA
Elisa_I7Iern	CTATAT	CATTG	ACAG	TTA	ATCC	AA	CCG	AA	CTA	AA	CC	CG	CA
Consensus	CTATAT	CATTG	ACAG	TTA	ATCC	AA	CCG	AA	CTA	AA	CC	CG	CA
701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830
PLASMIDO	TTTTCA	AGCT	TGCG	AA	TTCT	GG	CC	GG	CC	TG	GG	TT	CC
Elisa_I7Up	TTTTCA	AGCT	TGCG	AA	TTCT	GG	CC	GG	CC	TG	GG	TT	CC
Elisa_I7Iern	TTTTCA	AGCT	TGCG	AA	TTCT	GG	CC	GG	CC	TG	GG	TT	CC
Consensus	TTTTCA	AGCT	TGCG	AA	TTCT	GG	CC	GG	CC	TG	GG	TT	CC
841	850	860	870	880	890	900	910	920	930	937	940	950	960
PLASMIDO	CTGTG	CCACC	GCTG	AG	CA	TA	TA	CT	AG	CA	TA	TA	CT
Elisa_I7Up	CTGTG	CCACC	GCTG	AG	CA	TA	TA	CT	AG	CA	TA	TA	CT
Elisa_I7Iern	CTGTG	CCACC	GCTG	AG	CA	TA	TA	CT	AG	CA	TA	TA	CT
Consensus	CTGTG	CCACC	GCTG	AG	CA	TA	TA	CT	AG	CA	TA	TA	CT

Fig.11 (Continuación)

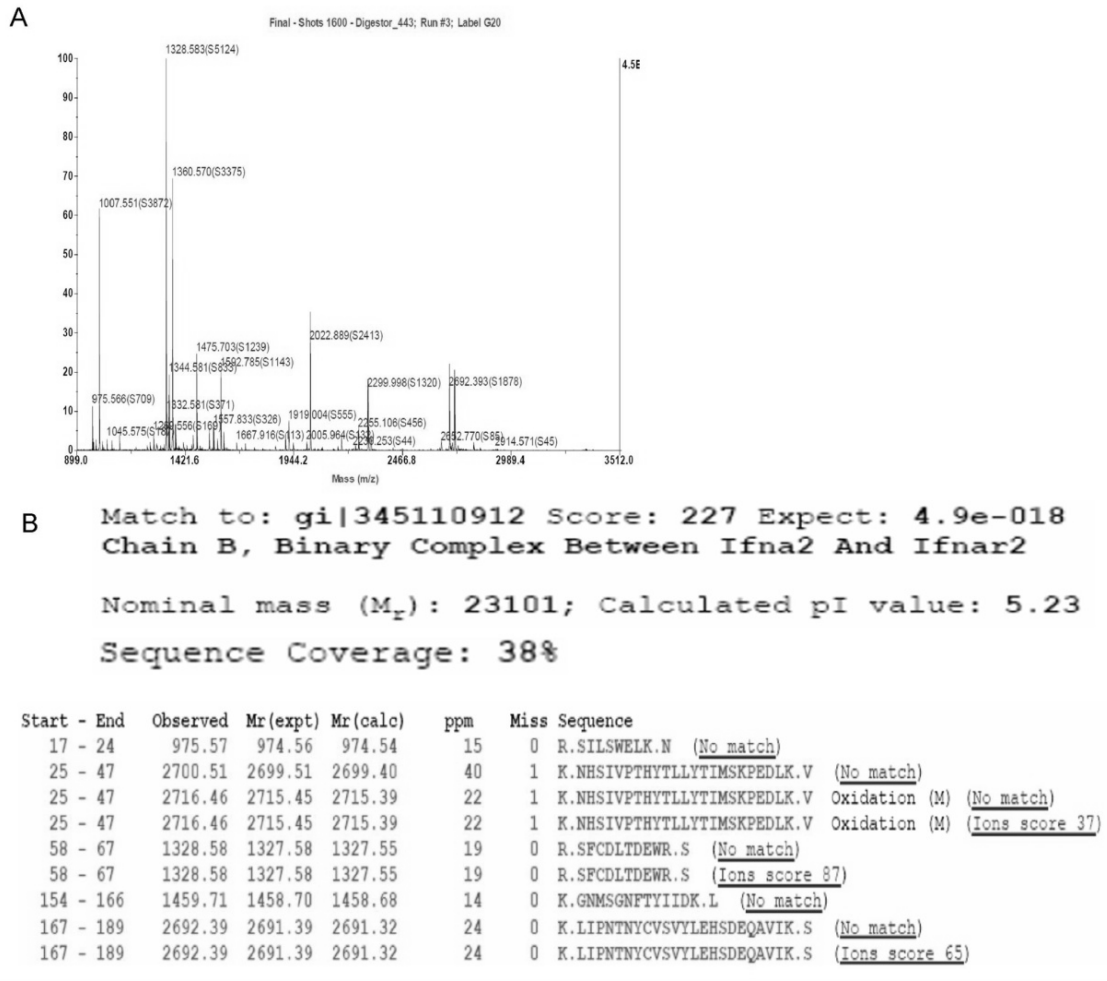


Fig.12

Listado de Secuencias

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

<120> Proteína recombinante como antiviral

<130> FIMABIS-15008

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2479

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

agatgtaaaa gtcaagagaa gactctaaaa atagcaaaga tgcttttgag ccagaatgcc      60
ttcatcttca gatcacttaa tttggttctc atgggtgata tcagcctcgt gtttggtatt      120
tcatatgatt cgctgatta cacagatgaa tcttgcactt tcaagatatac attgcgaaat      180
ttccgggtcca tcttatcatg ggaattaaaa aaccactcca ttgtaccaac tcaactataca      240
ttgctgtata caatcatgag taaaccagaa gatttgaagg tggttaagaa ctgtgcaaat      300
accacaagat cattttgtga cctcacagat gagtggagaa gcacacacga ggcctatgtc      360
accgtcctag aaggattcag cgggaacaca acgttgttca gttgctcaca caatttctgg      420
ctggccatag acatgtcttt tgaaccacca gagtttgaga ttgttggttt taccaaccac      480
attaatgtga tggtgaaatt tccatctatt gttgaggaag aattacagtt tgatttatct      540
ctcgtcattg aagaacagtc agaggaatt gtttaagaagc ataaaccga aataaaagga      600
aacatgagtg gaaatttcac ctatatcatt gacaagttaa ttccaaacac gaactactgt      660
gtatctgttt attagagca cagtgatgag caagcagtaa taaagtctcc cttaaaatgc      720
accctcctc cacctggcca ggaatcagaa ttttcataac tttttagcct ggccatttcc      780
taacctgcca ccgttggaag ccatggatat ggtggaggtc atttacatca acagaaagaa      840
gaaagtgtgg gattataatt atgatgatga aagtgatagc gatactgagg cagcgccag      900
gacaagtggc ggtggctata ccatgcatgg actgactgtc aggcctctgg gtcaggcctc      960
tgccacctct acagaatccc agttgataga cccggagtcc gaggaggagc ctgacctgcc     1020
tgaggttgat gtggagctcc ccacgatgcc aaaggacagc cctcagcagt tggaactctt     1080
gagtgggccc tgtgagagga gaaagagtcc actccaggac cttttcccg aagaggacta     1140
cagctccacg gaggggtctg ggggcagaat taccttcaat gtggacttaa actctgtggt     1200
tttgagagtt ctgatgacg aggacagtga cgacttagaa gccctctga tgctatcgtc     1260
tcatctggaa gagatggttg acccagagga tcctgataat gtgcaatcaa accatttgct     1320
ggccagcggg gaagggacac agccaacctt tcccagcccc tcttcagagg gcctgtggtc     1380
cgaagatgct ccatctgatc aaagtgacac ttctgagtca gatgttgacc ttggggatgg     1440
ttatataatg agatgactcc aaaactattg aatgaacttg gacagacaag cacctacagg     1500

```

ES 2 626 002 A1

gttctttgtc tctgcatcct aacttgctgc cttatcgtct gcaagtgttc tccaagggaa 1560
 ggaggaggaa actgtggtgt tcctttcttc caggtgacat cacctatgca cattcccagt 1620
 atggggacca tagtatcatt cagtgcattg tttacatatt caaagtgggtg cactttgaag 1680
 gaagcacatg tgcacctttc ctttacacta atgcacttag gatgtttctg catcatgtct 1740
 accaggggagc agggttcccc acagtttcag aggtggtcca ggaccctatg atattttctct 1800
 tctttcgttc tttttttttt ttttttgaga cagagtctcg ttctgtcgcc caagctggag 1860
 cgcaatggtg tgatcttggc tcaactgcaac atccgcctcc cgggttcagg tgattctcct 1920
 gcctcagcct ccctcgcaag tagctgggat tacaggcgcc tgccaccatg cctagcaaat 1980
 ttttgtattt ttagtggaga caggatttta ccatgttggc caggctggtc tcgaactcct 2040
 gacctcaagt gatctgcct cctcagcctc gtaaagtgtc gggattacag gggtgagccg 2100
 ctgtgcctgg ctggccctgt gatattttctg tgaataaat tgggccaggg tgggagcagg 2160
 gaaagaaaag gaaaatagta gcaagagctg caaagcaggc aggaagggag gaggagagcc 2220
 aggtgagcag tggagagaag gggggccctg cacaaggaaa caggaagag ccatcgaagt 2280
 ttcagtcggt gagccttggg cacctaccc atgtcacatc ctgtctcctg caattggaat 2340
 tccaccttgt ccagccctcc ccagttaaag tggggaagac agactttagg atcacgtgtg 2400
 tgactaatac agaaaggaaa catggcgctg gggagagggg taaaacctga atgcatatt 2460
 ttaagttaa aaaaaaaaa 2479

<210> 2
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 626 002 A1

Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu
 115 120 125

Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe
 130 135 140

Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly
 165 170 175

Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn
 180 185 190

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

Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro
 210 215 220

Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Phe Ser
 225 230 235

<210> 3
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sentido 5'-3'

<400> 3
 taaggcctct gtcgacattt catatgattc gcctgattac acgatg 46

<210> 4
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisentido 5'-3'

<400> 4
 cagaattcgc aagctttgaa aattctgatt cctggccagg tggaa 45

<210> 5
 <211> 932
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PLASMIDO con el inserto

<400> 5
 cggcgtagag gatcgaggtc tcgatccgc gaaattaata cgactcacta taggggaatt 60

gtgagcggat aacaattccc ctcttgaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata 120

ES 2 626 002 A1

ccatgggtaa ggcctctgtc gacatttcat atgattcgcc tgattacaca gatgaatcctt 180
gcactttcaa gatatcattg cgaaatttcc ggtccatcctt atcatgggaa ttaaaaaacc 240
actccattgt accaactcac tatacattgc tgtatacaat catgagtaaa ccagaagatt 300
tgaagggtgt taagaactgt gcaaatacca caagatcatt ttgtgacctc acagatgagt 360
ggagaagcac acacgaggcc tatgtcaccg tcctagaagg attcagcggg aacacaacgt 420
tgttcagttg ctcacacaat ttctggctgg ccatagacat gtcttttgaa ccaccagagt 480
ttgagattgt tggttttacc aaccacatta atgtgatggt gaaatttcca tctattgttg 540
aggaagaatt acagtttgat ttatctctcg tcattgaaga acagtcagag ggaattgtta 600
agaagcataa acccgaaata aaaggaaaca tgagtggaaa tttcacctat atcattgaca 660
agttaattcc aaacacgaac tactgtgtat ctgtttattt agagcacagt gatgagcaag 720
cagtaataaa gtctccctta aaatgcacc tccttcacc tggccaggaa tcagaatttt 780
caagcttgcg aattctggcg gccgcctggt tccgcgtggc tctccgggcg ctgcaggcca 840
taatcataat cataatcata atcataatca caattaatta attaattctag aggaagctga 900
gttggctgct gccaccgctg agcaataact ag 932

<210> 6
<211> 800
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Elisa_T7Up

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(28)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(80)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(85)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (799)..(800)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 6
nnnnnnnnnn nnnnnntat agggnnngt gagcggataa caattcccct cttgaaataa 60
ttttgtttaa cttnnnnnnn gaganatacc atgggtaagg cctctgtcga catttcatat 120

ES 2 626 002 A1

gattcgcctg attacacaga tgaatcttgc actttcaaga tatcattgcg aaatttccgg 180
tccatcttat catgggaatt aaaaaaccac tccattgtac caactcacta tacattgctg 240
tatacaatca tgagtaaacc agaagatttg aagggtggtta agaactgtgc aaataccaca 300
agatcatttt gtgacctcac agatgagtgg agaagcacac acgaggccta tgtcaccgtc 360
ctagaaggat tcagcgggaa cacaacgttg ttcagttgct cacacaatth ctggctggcc 420
atagacatgt cttttgaacc accagagttt gagattgttg gttttaccaa ccacattaat 480
gtgatggtga aatttccatc tattgttgag gaagaattac agtttgattt atctctcgtc 540
attgaagaac agtcagaggg aattgttaag aagcataaac ccgaaataaa aggaaacatg 600
agtggaaatt tcacctatat cattgacaag ttaattccaa acacgaacta ctgtgtatct 660
gtttatttag agcacagtga tgagcaagca gtaataaagt ctcccttaaa atgcaccctc 720
cttccacctg gccaggaatc agaattttca aagcttgcca attctggcgg ccgcctggtt 780
ccgcgtggct ctccgggcnn 800

<210> 7
<211> 800
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Elisa_T7Term

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(36)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(47)
<223> n is a, c, g, or t

ES 2 626 002 A1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(65)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(68)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (70)..(70)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (72)..(72)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (77)..(81)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (108)..(108)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (390)..(391)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (477)..(478)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (719)..(719)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (721)..(723)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (725)..(729)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (778)..(800)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 7
 ntntaagann ngantatacc catgggtaag ncnnnngtcg acatttncat atgatttcgc 60
 nnnnnttncn cngatgnnnn ntgcactttc aagatatcat tgcgaaantt tccggtccat 120
 cttatcatgg gaattaaaaa accactccat tgtaccaact cactatacat tgctgtatac 180
 aatcatgagt aaaccagaag atttgaaggt ggттааgаас tgtgcaaata ccacaagatc 240

ES 2 626 002 A1

at t t t g t g a c	c t c a c a g a t g	a g t g g a g a a g	c a c a c a c g a g	g c c t a t g t c a	c c g t c c t a g a	300
a g g a t t c a g c	g g g a a c a c a a	c g t t g t t c a g	t t g c t c a c a c	a a t t t c t g g c	t g g c c a t a g a	360
c a t g t c t t t t	g a a c c a c c a g	a g t t t g a g a n	n g t t g g t t t t	a c c a a c c a c a	t t a a t g t g a t	420
g g t g a a a t t t	c c a t c t a t t g	t t g a g g a a g a	a t t a c a g t t t	g a t t t a t c t c	t c g t c a n g a	480
a g a a c a g t c a	g a g g g a a t t g	t t a a g a a g c a	t a a a c c c g a a	a t a a a a g g a a	a c a t g a g t g g	540
a a a t t t c a c c	t a t a t c a t t g	a c a a g t t a a t	t c c a a a c a c g	a a c t a c t g t g	t a t c t g t t t a	600
t t t a g a g a c a c	a g t g a t g a g c	a a g c a g t a a t	a a a g t c t c c c	t t a a a a t g c a	c c c t c c t t c c	660
a c c t g g c c a g	g a a t c a g a a t	t t t c a a a g c t	t g c g a a t t c t	g g c g g c c g c c	t g g t t c c g n g	720
n n n c n n n n n g	g g c g c t g c a g	g t c a t a a t c a	t a a t c a t a a t	c a t a a t c a t a	a t c a c a a n n n	780
n n n n n n n n n n	n n n n n n n n n n					800