

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 366**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2018 PCT/EP2018/059170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2018 WO18189184**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2018 E 18717579 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021 EP 3610006**

54 Título: **Retrotranscriptasa mutante con un incremento en la estabilidad térmica así como productos, procedimientos y usos que involucran la misma**

30 Prioridad:

11.04.2017 EP 17000621

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

24.11.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BELL, CHRISTIAN HELMUT;
SOBEK, HARALD;
WALCH, HEIKO;
YASUKAWA, KIYOSHI y
BABA, MISATO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 880 366 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

Retrotranscriptasa mutante con un incremento en la estabilidad térmica así como productos, procedimientos y usos que involucran la misma

La presente invención se refiere a una retrotranscriptasa (RT) mutante con un incremento en la estabilidad térmica con respecto a la natural, un ácido nucleico que codifica la RT mutante, una célula que comprende la RT mutante o el ácido nucleico, un kit que comprende la RT mutante, el uso de la RT mutante para la síntesis de ADNc, procedimiento para la retrotranscripción de ARN que comprende sintetizar ADNc con el uso de la RT mutante y un procedimiento para detectar un marcador de ARN en una muestra con el uso de la RT mutante.

La retrotranscriptasa (RT) [EC 2.7.7.49] es la enzima responsable de la replicación del genoma vírico. Posee ADN polimerasa dependiente de ARN y ADN, así como actividades RNasa H. Las RT del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) se usan ampliamente en síntesis de ADNc porque tienen alta fidelidad y actividad catalítica. Para la síntesis de ADNc, es deseable una mayor temperatura de reacción porque reduce las estructuras secundarias de ARN y la unión a cebador inespecífica. Por lo tanto, mejorar la estabilidad térmica de RT es un objetivo importante. La estabilidad térmica de RT MMLV (Kotewicz *et al.*, 1985; Gerard *et al.*, 2002; Mizuno *et al.*, 2010) se ha mejorado eliminando la actividad RNasa H. En los últimos años, la estabilidad térmica de RT MMLV se mejoró además introduciendo cargas positivas en posiciones que han estado implicadas en la interacción con un molde-cebador (Yasukawa *et al.*, 2010), por mutagénesis aleatoria (Arezi y Hogrefe, 2009; Baranauskas *et al.*, 2012) y cambiando un residuo hidrofóbico superficial por uno hidrófilo (Konishi *et al.*, 2014). Como resultado, la temperatura de reacción para la síntesis de ADNc se ha incrementado de 37-45 °C a 50-55 °C. Sin embargo, se desea una estabilización adicional para mejorar la eficacia de la síntesis de ADNc.

Para diversas enzimas, se han realizado extensamente mutagénesis dirigida a sitio y/o mutaciones aleatorias, y se han identificado diversas mutaciones que confieren a las enzimas propiedades deseables, tales como una potenciación en la actividad catalítica o termoestabilidad. Si los efectos de estas mutaciones fueron aditivos, una enzima variante con múltiples mutaciones tendría propiedades más deseables. Sin embargo, es conocido en general que existe un compromiso entre actividad y estabilidad en diversas enzimas: las mutaciones que incrementan la actividad enzimática se acompañan de una disminución en la estabilidad proteínica, y las que incrementan la estabilidad proteínica disminuyen la actividad enzimática (Shoichet *et al.*, 1995). Además, actualmente no es fácil predecir el efecto de la combinación mutacional sobre las propiedades enzimáticas. MM3 (E286R/E302K/L435R) es una variante triple de RT MMLV termoestable generada introduciendo tres mutaciones destinadas a incrementar las cargas positivas en la RT MMLV natural (Yasukawa *et al.*, 2010).

Sin embargo, fue un objetivo de la presente invención proporcionar otras retrotranscriptasas mutantes termoestables derivadas de MMLV.

Para esto se diseñaron 29 mutaciones. Las correspondientes variantes individuales se produjeron en *Escherichia coli* y se caracterizaron por su actividad y estabilidad, y se seleccionaron seis mutaciones (Ala32→Val, Leu41→Arg, Leu72→Arg, Ile212→Arg, Leu272→Glu y Trp388→Arg). Se diseñaron quince variantes múltiples combinando una o más de las seis mutaciones con la mutación MM3. Se produjeron y caracterizaron las correspondientes variantes múltiples. Una variante séxtuple MM3.14 (A32V/L72R/E286R/E302K/W388R/L435R) presentó mayor estabilidad térmica que la natural o MM3 mutante (véase el ejemplo 2 y figuras 4E, 4F, 5 y 6).

En consecuencia, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una retrotranscriptasa (RT) mutante con un incremento en la estabilidad térmica con respecto a la RT natural de SEQ ID NO: 1, comprendiendo la RT mutante

i) una secuencia de aminoácidos que tiene seis sustituciones aminoacídicas con respecto a la RT natural de SEQ ID NO: 1, en la que

- Ala en la posición 32 se sustituye con Val (A32V);
- Leu en la posición 72 se sustituye con Arg (L72R);
- Glu en la posición 286 se sustituye con Arg (E286R);
- Glu en la posición 302 se sustituye con Lys (E302K);
- Trp en la posición 388 se sustituye con Arg (W388R); y
- Leu en la posición 435 se sustituye con Arg (L435R), o

ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de i) y tiene

las seis sustituciones aminoacídicas como se define en i),

en la que la RT mutante presenta actividad retrotranscriptasa; y en la que la RT mutante tiene un incremento en la estabilidad térmica con respecto a la MM3 mutante, en la que MM3 tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de SEQ ID NO: 1 solo en tres sustituciones aminoacídicas, en la que Glu en la posición 286 se sustituye con Arg (E286R), Glu en la posición 302 se sustituye con Lys (E302K) y Leu en la posición 435 se sustituye con Arg (L435R).

Una retrotranscriptasa (RT) es una enzima usada para generar ADN complementario (ADNc) de un molde de ARN, un proceso denominado retrotranscripción. Se asocia principalmente a retrovirus. Sin embargo, los no retrovirus también usan RT (por ejemplo, el virus de la hepatitis B, un miembro de *Hepadnaviridae*, que son virus ADNbc-RT, mientras que los retrovirus son virus ARNmc). La RT retrovítica tiene tres actividades bioquímicas secuenciales: actividad ADN polimerasa dependiente de ARN, ribonucleasa H y actividad ADN polimerasa dependiente de ADN. Estas actividades se usan por el retrovirus para convertir ARN genómico monocatenario en ADNc bicatenario que se puede integrar en el genoma del huésped, generando potencialmente una infección prolongada que puede ser muy difícil de erradicar. La misma secuencia de reacciones se usa ampliamente en el laboratorio para convertir ARN en ADN para su uso en clonación molecular, secuenciación de ARN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o análisis del genoma. Una retrotranscriptasa que se usa comúnmente en el campo es la retrotranscriptasa MMLV del virus de la leucemia murina de Moloney.

De acuerdo con la presente invención, la RT mutante presenta actividad retrotranscriptasa. Esto quiere decir que la RT mutante puede generar un ADNc de un molde de ARN en condiciones adecuadas. Los procedimientos para determinar la actividad transcriptasa se describen en el presente documento y se dan en los ejemplos (véanse el ensayo de retrotranscripción usando $[^3\text{H}]$ -dTTP, ensayo de retrotranscripción usando tinte fluorescente PicoGreen y síntesis de ADNc).

Además, la retrotranscriptasa (RT) mutante tiene un incremento en la estabilidad térmica con respecto a la RT natural de SEQ ID NO: 1. El término "incremento en la termoestabilidad" o "incremento en la estabilidad térmica" con respecto a la RT natural quiere decir que la RT mutante es menos propensa a la pérdida de actividad (enzimática) a temperaturas elevadas (es decir, por encima de la temperatura ambiente o en particular por encima de 40 °C). La estabilización de enzimas incluyendo la evitación de mecanismos de desnaturalización para llevar a cabo su potencial completo como catalizadores es un objetivo importante en biotecnología. La estabilización de enzimas tiene una importancia notable debido al número creciente de aplicaciones enzimáticas. El incremento en la estabilidad permite una usabilidad mantenida (por ejemplo, almacenamiento más largo, usabilidad durante un tiempo más largo, etc.). Además, para la síntesis de ADNc, es deseable una mayor temperatura de reacción porque reduce las estructuras secundarias de ARN y la unión a cebador inespecífica. Por lo tanto, es deseable mejorar la estabilidad térmica de RT. El incremento en la estabilidad de la mutante con respecto a la natural se puede determinar comparando la actividad restante de ambas enzimas (natural y mutante), por ejemplo, después del almacenamiento o exposición a una condición particular (por ejemplo, temperatura elevada, secado, tampón o sal) (actividad restante absoluta). De forma alternativa, la estabilidad se mejora en comparación con la natural, si la mutante, por ejemplo, tiene una mayor actividad restante relativa. La actividad restante relativa se puede determinar comparando la acidez restante o residual después de la incubación en condiciones dadas (por ejemplo, tiempo, temperatura) con la actividad inicial antes de la incubación.

Los términos actividad enzimática y su determinación son bien conocidos para el experto en la técnica. La actividad enzimática se define en general como la conversión de la cantidad de sustrato por tiempo. La unidad del SI para la actividad enzimática es catal (1 catal = 1 mol s⁻¹). Un valor más práctico y comúnmente usado es la unidad enzimática (U) = 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. 1 U corresponde a 16,67 nanocatalas y se define como la cantidad de la enzima que cataliza la conversión de 1 micromol de sustrato por minuto. La actividad específica de una enzima es la actividad de una enzima por miligramo de proteína total (expresada en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

La actividad enzimática se puede determinar en un ensayo midiendo el consumo de sustrato o cofactor o bien la formación de producto con el tiempo. Existe un gran número de procedimientos diferentes de medición de las concentraciones de sustratos y productos, y se pueden someter a ensayo muchas enzimas de varias formas diferentes como es conocido para el experto en la técnica. En la presente invención, la RT en cuestión se incubaba, por ejemplo, con un molde de ARN, cebadores y una mezcla de dNTP adecuada y se sigue la producción de ADNc o consumo de dNTP. El seguimiento se puede realizar, por ejemplo, por medición de la absorbancia UV a 260 nm, incorporación de marcadores (por ejemplo, $[^3\text{H}]$ -dTTP; véanse los ejemplos), unión de los marcadores a ADN (por ejemplo, PicoGreen®) o PCR (véanse los ejemplos).

En un modo de realización preferente de la presente invención, el incremento en la estabilidad térmica de la RT mutante con respecto a la RT respectiva sin mutación se puede determinar y expresar como actividad restante después de una incubación bajo agresión (por ejemplo, 10 min a, por ejemplo, 60 °C o cualquier otra condición dada en los ejemplos) con respecto a la actividad inicial antes de la incubación bajo agresión (véanse los ejemplos). Para esto, se puede seguir la reacción enzimática como se detalla anteriormente o en los ejemplos y se puede calcular el cambio en la actividad. Los valores obtenidos para muestras incubadas con calor se pueden comparar

con la muestra sin agresión (valor fijado en un 100 % de actividad) y calcularse en porcentaje de actividad (actividad (muestra con agresión)/actividad (muestra sin agresión)*100). En consecuencia, el valor de una mutante mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa una mejora en la estabilidad térmica. La estabilidad se incrementa si [% de actividad restante de la mutante] - [% de actividad restante de la natural] > 0. De forma alternativa, la actividad restante de la mutante también se puede expresar como actividad en porcentaje y se puede calcular como sigue: [% de actividad restante de la mutante] / [% de actividad restante de la natural] * 100 %. La estabilidad de la mutante con respecto a la natural se incrementa si el valor resultante es > 100 %. Las pruebas adecuadas particulares para determinar la estabilidad se describen en los ejemplos. La prueba de síntesis de ADNc con PCR ultrarrápida (véase la figura 5) parece proporcionar la prueba más sensible.

Un procedimiento adecuado para la determinación del incremento en la estabilidad térmica se detalla en los ejemplos. Las condiciones ejemplares para las condiciones de agresión pueden ser preincubación a 48-65 °C (en particular 60 °C) durante 10 min y someter a prueba después de esto con ensayo de retrotranscripción usando [³H]-dTTP, ensayo de retrotranscripción usando tinte fluorescente PicoGreen o preferentemente una prueba de síntesis de ADNc con PCR ultrarrápida.

La RT de la presente invención se deriva de RT MMLV, que es un monómero de 75 kDa. Está compuesta de los dominios de dedos, palma, pulgar, conexión y RNasa H. El sitio activo de la reacción de la ADN polimerasa reside en el dominio de dedos/palma/pulgar, mientras que el de la reacción de la RNasa H se encuentra en el dominio de la RNasa H.

La secuencia de aminoácidos de la RT denominada RT natural, incluyendo la numeración de los aminoácidos, es como sigue:

TLNIEDEHRL	HETSKEPDVS	LGSTWLSDFP	QAWAETGGMG	LAVRQAPLII	PLKATSTPVS	60
IKQYPMSQEA	RLGIKPHIQR	LLDQGILVPC	QSPWNTPLL	VKKPGTNDYR	PVQDLREVNK	120
RVEDIHPTVP	NPYNLLSGLP	PSHQWYTVLD	LKDAFFCLRL	HPTSQPLFAF	EWRDPEMGIS	180
GQLTWTRLPO	GFKNSPTLFD	EALHRDLADF	RIQHPDLILL	QYVDDLALLA	TSELDCQQGT	240
RALLQTLGNL	GYRASAKKAQ	ICQKQVKYLG	YLLKEGQRWL	TEARKEETVMG	QPTPKTPRQL	300
REFLGTAGFC	RLWIPGFAEM	AAPLYPLTKT	GTLFNWGPDQ	QKAYQEIKQA	LLTAPALGLP	360
DLTKPFELFV	DEKQGYAKGV	LTQKLGPWRR	PVAYLSKKLD	PVAAGWPPCL	RMVAAIAVLT	420
KDAGKLTMGQ	PLVILAPHAV	EALVKQPPDR	WLSNARMTHY	QALLLDTRV	QFGPVVALNP	480
ATLLPLPEEG	LQHNCLDILA	EAHGTRPDLT	DQPLPDADHT	WYTDGSSLLQ	EGQRKAGAAV	540
TTETEVIAWAK	ALPAGTSAQR	AELIALTQAL	KMAEGKKNV	YTDSRYAFAT	AHIHGEIYRR	600
RGLLTSEGKE	IKNKDEILAL	LKALFLPKRL	SIHCPGHQK	GHSAEARGNR	MADQAARKAA	660
ITETPDTSTL	L					671

(SEQ ID NO: 1)

La correspondiente secuencia de ácido nucleico es como sigue:

accctaaata	tagaagatga	gcatcggcta	catgagacct	caaaagagcc	agatgtttct	60
ctaggggtcca	catggctgtc	tgattttcct	caggcctggg	cggaacccgg	gggcatggga	120
ctggcagttc	gccaagctcc	tctgatcata	cctctgaaag	caacctctac	ccccgtgtcc	180
ataaaaacaat	accccatgtc	acaagaagcc	agactgggga	tcaagcccca	catacagaga	240
ctgttggtacc	aggaataact	ggtaccctgc	cagtccccct	ggaacacgcc	cctgctaccc	300
gttaagaaac	cagggactaa	tgattatagg	cctgtccagg	atctgagaga	agtcaacaag	360
cgggtggaag	acatccaccc	caccgtgcc	aacccttaca	acctcttgag	cgggctccca	420
ccgtcccacc	agtgggtacac	tgtgcttgat	ttaaaggatg	cctttttctg	cctgagactc	480

```

caccaccacca gtcagcctct cttcgccctt gagtggagag atccagagat gggaatctca 540
ggacaattga cctggaccag actcccacag gggttcaaaa acagtccac cctgtttgat 600
gaggcactgc acagagacct agcagacttc cggatccagc acccagactt gatcctgcta 660
cagtacgtgg atgacttact gctggccgcc acttctgagc tagactgcca acaaggtact 720
cgggccctgt tacaaccct agggaaacct gggatatcgg cctcggccaa gaaagcccaa 780
atttgccaga aacaggtcaa gtatctgggg tatcttctaa aagaggggtca gagatggctg 840
actgaggcca gaaaagagac tgtgatgggg cagcctactc cgaagacccc tcgacaacta 900
agggagttcc tagggacggc aggccttctgt cgcctctgga tccctgggtt tgcagaaatg 960
gcagccccct tgtaccctct caccaaaacg gggactctgt ttaattgggg cccagaccaa 1020
caaaaggcct atcaagaaat caagcaagct cttctaactg cccagccct ggggttgcca 1080
gatttgacta agccctttga actctttgtc gacgagaagc agggctacgc caaaggtgtc 1140
ctaacgcaaa aactgggacc ttggcgtcgg ccggtggcct acctgtccaa aaagctagac 1200
ccagtagcag ctgggtggcc cccttgccca cggatggtag cagccattgc cgtactgaca 1260
aaggatgcag gcaagctaac catgggacag ccactagtca ttctggcccc ccattgcagta 1320
gaggcactag tcaaacacc ccccgaccgc tggctttcca acgcccggat gactcactat 1380
caggccttgc ttttgacac ggaccgggtc cagttcggac cgggtggtagc cctgaacccg 1440
gctacgctgc tcccactgcc tgaggaagg ctcgaacaca actgccttga tatcctggcc 1500
gaagcccacg gaaccggacc cgacctaacg gaccagccgc tcccagacgc cgaccacacc 1560
tggtacacgg atggaagcag tctcttacia gagggacagc gtaaggcggg agctgcggtg 1620
accaccgaga ccgaggtaat ctgggctaaa gccctgccag ccgggacatc cgctcagcgg 1680
gctgaactga tagcactcac ccaggcccta aagatggcag aaggtaagaa gctaaatgtt 1740
tatactgata gccgttatgc ttttgctact gcccatatcc atggagaaat atacagaagg 1800
cgtgggttgc tcacatcaga aggcaaagag atcaaaaata aagacgagat cttggcccta 1860
ctaaaagccc tctttctgcc caaaagactt agcataatcc attgtccagg acatcaaaag 1920
ggacacagcg ccgaggctag aggcaaccgg atggctgacc aagcggcccc aaaggcagcc 1980
atcacagaga ctccagacac ctctaccctc ctc 2013

```

(SEQ ID NO: 7)

5

El término "retrotranscriptasa mutante" (RT) se refiere a una enzima RT con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en al menos seis mutaciones. Como se detalla anteriormente, la RT mutante de la presente invención tiene seis sustituciones aminoacídicas obligatorias con respecto a la RT natural de SEQ ID NO: 1, en la que

10

- Ala en la posición 32 se sustituye con Val (A32V);
- Leu en la posición 72 se sustituye con Arg (L72R);
- 15 - Glu en la posición 286 se sustituye con Arg (E286R);
- Glu en la posición 302 se sustituye con Lys (E302K);
- Trp en la posición 388 se sustituye con Arg (W388R); y
- 20 - Leu en la posición 435 se sustituye con Arg (L435R).

La secuencia de aminoácidos de la RT mutante que difiere de la RT natural de SEQ ID NO: 1 solo por las seis mutaciones obligatorias anteriores se denomina secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y es como sigue:

25

```

                                32
TLNIEDEHRL HETSKEPDVS LGSTWLSDFP QVWAETGGMG LAVRQAPLII PLKATSTPVS 60
                                72
IKQYPMSQEA RRGIKPHIQR LLDQGILVPC QSPWNTPLLP VKKPGTNDYR PVQDLREVNK 120
RVEDIHPTVP NPYNLLSGLP PSHQWYTVLD LKDAFFCLRL HPTSQPLFAF EWRDPEMGIS 180
GQLTWTRLPQ GFKNSPTLFD EALHRDLADF RIQHPDLILL QYVDDLLAA TSELDCQOGT 240
                                286
RALLQTLGNL GYRASAKKAQ ICQKQVKYLG YLLKEGQRWL TEARKRTVMG QPTPKTPRQL 300
302

```

ES 2 880 366 T3

R KFLGTAGFC	RLWIPGFAEM	AAPLYPLTKT	GTLFNWGPDQ	QKAYQEIKQA	LLTAPALGLP	360
388						
DLTKPFELFV	DEKQGYAKGV	LTQKLGP R RR	PVAYLSKKLD	PVAAGWPPCL	RMVAAIAVLT	420
435						
KDAGKLTMGQ	PLVIRAPHAV	EALVKQPPDR	WLSNARMTHY	QALLLDTRV	QFGPVVALNP	480
ATLLPLPEEG	LQHNCLDILA	EAHGTRPDLT	DQPLPDADHT	WYTDGSSLLQ	EGQRKAGAAV	540
TTETEVIAWAK	ALPAGTSAQR	AELIALTQAL	KMAEGKKLNV	YTDSRYAFAT	AHIHGEIYRR	600
RGLLTSEGKE	IKNKDEILAL	LKALFLPKRL	SIHCPGHQK	GHSAEARGNR	MADQAARKAA	660
ITETPDSTL	L					671

(SEQ ID NO: 2)

- 5 Las seis mutaciones obligatorias se indican por letras en negrita con subrayado y sus posiciones se especifican por los números de aminoácidos respectivos.

La correspondiente secuencia de ácido nucleico es como sigue:

accctaaata	tagaagatga	gcacgggcta	catgagacct	caaaagagcc	agatgtttct	60
ctaggggtcca	catggctgtc	tgatttttct	caggtctggg	cggaaccggg	gggcatggga	120
ctggcagttc	gccaaagctc	tctgatcata	cctctgaaag	caacctctac	ccccgtgtcc	180
ataaaacaat	accccatgtc	acaagaagcc	agacggggga	tcaagcccca	catacagaga	240
ctgttggaac	agggaatact	ggtaccctgc	cagtcctcct	ggaacacgcc	cctgctaccc	300
gttaagaaac	cagggactaa	tgattatagg	cctgtccagg	atctgagaga	agtcaacaag	360
cgggtggaag	acatccaccc	caccgtgccc	aacccttaca	acctcttgag	cgggctccca	420
ccgtcccacc	agtgttacac	tgtgcttgat	ttaaaggatg	cctttttctg	cctgagactc	480
cacccaccca	gtcagcctct	cttcgccttt	gagtggagag	atccagagat	gggaatctca	540
ggacaattga	cctggaccag	actcccacag	ggtttcaaaa	acagtcccac	cctgtttgat	600
gaggcactgc	acagagacct	agcagacttc	cggatccagc	accagactt	gatcctgcta	660
cagtacgtgg	atgacttact	gctggccgcc	acttctgagc	tagactgcca	acaaggtact	720
cgggcccctgt	tacaaaccct	agggaaacctc	gggtatcggg	cctcggccaa	gaaagcccaa	780
atttgccaga	aacaggtcaa	gtatctgggg	tatcttctaa	aagaggggtca	gagatggctg	840
actgaggcca	gaaaacgtac	tgtgatgggg	cagcctactc	cgaagacccc	tcgacaacta	900
aggaagtcc	tagggacggc	aggcttctgt	cgcctctgga	tccctgggtt	tcgagaaatg	960
gcagccccct	tgtaccctct	caccaaaccg	gggactctgt	ttaattgggg	cccagaccaa	1020
caaaaggcct	atcaagaaat	caagcaagct	cttctaactg	ccccagccct	ggggttgcca	1080
gatttgacta	agccctttga	actctttgtc	gacgagaagc	agggtacgc	caaaggtgtc	1140
ctaacgcaaa	aactgggacc	tcggcgctcg	cgggtggcct	acctgtccaa	aaagctagac	1200
ccagtagcag	ctgggtggcc	cccttgcccta	cggatggtag	cagccattgc	cgtactgaca	1260
aaggatgcag	gcaagctaac	catgggacag	ccactagtca	ttcgcgcccc	ccatgcagta	1320
gaggcactag	tcaaacaacc	ccccgaccgc	tggttttcca	acgcccggat	gactcactat	1380
caggccttgc	ttttggacac	ggaccgggtc	cagttcggac	cgggtgtagc	cctgaaccgc	1440
gctacgctgc	tcccactgcc	tgaggaaggg	ctgcaacaca	actgccttga	tatcctggcc	1500
gaagcccacg	gaacccgacc	cgacctaacg	gaccagccgc	tcccagacgc	cgaccacacc	1560
tggtacacgg	atggaagcag	tctcttacaa	gagggacagc	gtaaggcggg	agctgcgggtg	1620
accacccaga	ccgaggtaat	ctgggctaaa	gccctgccag	ccgggacatc	cgctcagcgg	1680
gctgaactga	tagcactcac	ccaggcccta	aagatggcag	aaggtaagaa	gctaaatggt	1740
tatactgata	gccgttatgc	ttttgctact	gcccataatc	atggagaaat	atacagaagg	1800
cgtgggttgc	tcacatcaga	aggcaaagag	atcaaaaata	aagacgagat	cttggcccta	1860
ctaaaagccc	tctttctgcc	caaaagactt	agcataatcc	attgtccagg	acatcaaaag	1920
ggacacagcg	ccgaggctag	aggcaaccgg	atggctgacc	aagcggcccc	aaaggcagcc	1980
atcacagaga	ctccagacac	ctctaccctc	ctc			2013

(SEQ ID NO: 3)

- 15 Sin embargo, la RT mutante puede tener una o más de otras sustituciones, adiciones, deleciones aminoacídicas o combinaciones de las mismas. De acuerdo con la presente invención, la RT mutante de la presente invención también puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y tiene las seis sustituciones aminoacídicas obligatorias como se define anteriormente (A32V/L72R/E286R/E302K/W388R/L435R).

En un modo de realización de la presente invención, la RT mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más sustituciones aminoacídicas, en particular un número limitado de sustituciones (por ejemplo, hasta 30, 20 o en especial 10 sustituciones aminoacídicas), sustituciones en particular conservadoras. "Sustitución aminoacídica conservadora" se refiere a una sustitución de un residuo con un residuo diferente que tiene una cadena lateral similar y, por tanto típicamente involucra la sustitución del aminoácido en el polipéptido con aminoácidos dentro de la misma clase de aminoácidos definida o de una clase similar. A modo de ejemplo y sin limitación, un aminoácido con una cadena lateral alifática se puede sustituir con otro aminoácido alifático, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina; un aminoácido con cadena lateral hidroxilo se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina; un aminoácido que tiene cadenas laterales aromáticas se sustituye con otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina; un aminoácido con una cadena lateral básica se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral básica, por ejemplo, lisina y arginina; un aminoácido con una cadena lateral ácida se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral ácida, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico; y un aminoácido hidrófobo o hidrófilo se reemplaza con otro aminoácido hidrófobo o hidrófilo, respectivamente. Los ejemplos de sustituciones aminoacídicas conservadoras incluyen las enumeradas a continuación:

<u>Residuo original</u>	<u>Sustituciones conservadoras</u>
Ala, Leu, Val, Ile	Otros alifáticos (Ala, Leu, Val, Ile) Otros no polares (Ala, Leu, Val, Ile, Gly, Met)
Gly, Met	Otros no polares (Ala, Leu, Val, Ile, Gly, Met)
Asp, Glu	Otros ácidos (Asp, Glu)
Lys, Arg	Otros básicos (Lys, Arg)
Asn, Gln, Ser, Thr	Otros polares (Asn, Gln, Ser, Thr)
His, Tyr, Trp, Phe	Otros aromáticos (His, Tyr, Trp, Phe)
Cys, Pro	Ninguno

En un modo de realización de la presente invención, la RT mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más adiciones aminoacídicas, en particular adiciones aminoacídicas terminales o internas pequeñas (por ejemplo, hasta 30, 20 o en especial 10 aminoácidos).

En un modo de realización de la presente invención, la RT mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más delecciones aminoacídicas, en particular delecciones N y/o C terminales. Las delecciones pueden ser pequeñas (por ejemplo, hasta 5, 4, 3, 2, en especial 1, aminoácido(s) en cada extremo). En un modo de realización preferente, la RT mutante difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 por la delección de como máximo cinco aminoácidos en el extremo N de SEQ ID NO: 1 y/o por la delección de como máximo cinco aminoácidos en el extremo C de SEQ ID NO: 1, además de las mutaciones obligatorias como se define anteriormente.

En otro modo de realización, la secuencia de la RT mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender además de las mutaciones (sustituciones) obligatorias, una combinación de una o más delecciones, sustituciones o adiciones como se define anteriormente. Sin embargo, la RT mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El término "al menos un 95 % idéntica" o "al menos un 95 % de identidad de secuencia" como se usa en el presente documento quiere decir que la secuencia de la RT mutante de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos caracterizada por que, dentro de un tramo de 100 aminoácidos, al menos 95 residuos aminoacídicos son idénticos a la secuencia de la correspondiente secuencia de SEQ ID NO: 2. Las identidades de secuencia de otros porcentajes se definen en consecuencia.

La identidad de secuencia de acuerdo con la presente invención se puede determinar, por ejemplo, por procedimientos de alineación de secuencias en forma de comparación de secuencias. Los procedimientos de alineación de secuencias son bien conocidos en la técnica e incluyen diversos programas y algoritmos de

alineación. Además, la NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) está disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. El porcentaje de identidad de mutantes de acuerdo con la presente invención con respecto a la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 se caracteriza típicamente usando Blast blastp de NCBI con ajustes estándar. De forma alternativa, la identidad de secuencia se puede determinar usando el programa informático GENEious con ajustes estándar.

Los resultados de alineación se pueden derivar, por ejemplo, del programa informático Geneious (versión R8), usando el protocolo de alineación global con huecos de extremo libre como tipo de alineación y Blosum62 como matriz de puntuación.

Como se detalla anteriormente, la RT mutante de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En un modo de realización preferente, la RT mutante comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 96 %, 97 %, 98 % o un 99 %, en particular un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La identidad de secuencia se puede determinar como se describe anteriormente.

Todavía en otro modo de realización preferente, la RT mutante tiene una estabilidad térmica con respecto a la MM3 mutante que es igual o incluso se incrementa en la que MM3 tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de la SEQ ID NO: 1 solo en tres sustituciones aminoacídicas, en la que Glu en la posición 286 se sustituye con Arg (E286R), Glu en la posición 302 se sustituye con Lys (E302K) y Leu en la posición 435 se sustituye con Arg (L435R). MM3 (E286R/E302K/L435R) es una variante triple de RT MMLV termoestable generada introduciendo tres mutaciones destinadas a incrementar las cargas positivas en la RT MMLV natural (Yasukawa *et al.*, 2010).

Preferentemente, la estabilidad térmica se determina midiendo la actividad retrotranscriptasa de la mutante medida después de tratamiento térmico, en particular después de incubación a 60 °C durante 10 minutos. De forma alternativa o adicionalmente, la estabilidad térmica se incrementa en al menos un 10 %, 20 %, 30 % o 40 %, preferentemente al menos un 50 % con respecto a la RT natural o MM3 mutante. Los detalles sobre estos modos de realización se dan anteriormente.

También preferentemente, la actividad retrotranscriptasa de la RT mutante (sin agresión) es al menos un 50 % de la actividad retrotranscriptasa natural, en particular al menos un 60 %, más en particular al menos un 70 %, en especial al menos un 80 %. De forma alternativa o adicionalmente, la actividad retrotranscriptasa se determina por incorporación de dTTP mediada por RT a 37 °C (véanse los ejemplos). Los detalles sobre la determinación de la actividad enzimática se dan anteriormente.

En otro modo de realización, la RT mutante se puede fusionar con otra proteína. Las proteínas de fusión son proteínas creadas por la unión de dos o más proteínas o péptidos originalmente separados. Este procedimiento da como resultado un polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. En consecuencia, dependiendo del uso previsto de la RT se puede combinar con otro péptido o proteína en una proteína de fusión. Las proteínas se pueden fusionar por medio de un conector o espaciador, lo que incrementa la probabilidad de que las proteínas se plieguen independientemente y se comporten como se espera. En especial en el caso donde los conectores permiten la purificación de proteínas, los conectores en fusiones de proteínas o péptidos a veces se genomanipulan con sitios de escisión para proteasas o agentes químicos que permiten la liberación de las dos proteínas separadas. Se pueden fabricar proteínas de fusión di- o multiméricas a través de genomanipulación por fusión a las proteínas originales de dominios peptídicos que inducen di- o multimerización de proteínas artificiales (por ejemplo, cremalleras de leucina o estreptavidina). También se pueden fabricar proteínas de fusión con toxinas o anticuerpos unidos a ellas. Otras fusiones incluyen la adición de secuencias señal, tales como una secuencia señal de lipidación, una secuencia señal de secreción, una secuencia señal de glucosilación, un péptido señal de traslocación, etc.

Preferentemente, la proteína de fusión de la presente invención comprende una marca. Las marcas se unen a proteínas para diversos propósitos, por ejemplo, para facilitar la purificación, para ayudar en el plegamiento apropiado en proteínas, para evitar la precipitación de la proteína, para alterar propiedades cromatográficas, para modificar la proteína o para marcar la proteína. Los ejemplos de marcas incluyen marca Arg, la marca His, la marca Strep, la marca Flag, la marca T7, la marca peptídica V5, la marca GST y la marca c-Myc. Una marca preferente en la presente invención es una marca His que consiste en seis residuos histidina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la RT mutante de la presente invención.

El término "ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere en general a cualquier molécula de nucleótido que codifica la RT mutante de la invención y que puede ser de longitud variable. Los ejemplos de un ácido nucleico de la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores, o cualquier tipo de fragmento(s) de ADN y/o ARN que se pueden aislar por procedimientos de biología molecular estándar, incluyendo, por ejemplo,

cromatografía de intercambio iónico. Se puede usar un ácido nucleico de la invención para transfección o transducción de una célula u organismo particular.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, por ejemplo, obtenido por clonación o producido por técnicas de síntesis química o por una combinación de las mismas. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada la hebra antisentido. La molécula de ácido nucleico como se usa en el presente documento también se refiere a, entre otros, ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de ARN mono- y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o tricatenarias, o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. Además, la molécula de ácido nucleico como se usa en el presente documento se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN.

Adicionalmente, el ácido nucleico puede contener una o más bases modificadas. Dichos ácidos nucleicos también pueden contener modificaciones, por ejemplo, en la cadena principal ribosa-fosfato para incrementar la estabilidad y semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos. Por tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otros motivos son la "molécula de ácido nucleico" ya que ese rasgo característico está previsto en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son la molécula de ácido nucleico dentro del contexto de la presente invención. Se apreciará que se han realizado una gran variedad de modificaciones al ADN y ARN que sirven de muchos propósitos útiles conocidos para los expertos en la técnica. El término molécula de ácido nucleico como se emplea en el presente documento abarca dichas formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de la molécula de ácido nucleico, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células simples y complejas, entre otras.

Además, la molécula de ácido nucleico que codifica la RT mutante de la invención se puede enlazar de forma funcional, usando técnicas estándar tales como técnicas de clonación estándar, a cualquier secuencia deseada, tal como una secuencia reguladora, secuencia líder, secuencia marcadora heteróloga o una secuencia codificante heteróloga para crear una proteína de fusión.

El ácido nucleico de la invención se puede formar originalmente *in vitro* o en una célula en cultivo, en general, por la manipulación de ácidos nucleicos por endonucleasas y/o exonucleasas y/o polimerasas y/o ligasas y/o recombinasas u otros procedimientos conocidos para el profesional experto en la técnica para producir los ácidos nucleicos.

El ácido nucleico de la invención puede estar comprendido en un vector de expresión, en el que el ácido nucleico se enlaza de forma funcional a una secuencia de promotor que puede promover la expresión del ácido nucleico en una célula huésped.

Como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere en general a cualquier tipo de molécula de ácido nucleico que se puede usar para expresar una proteína de interés en una célula (véanse también anteriormente detalles sobre los ácidos nucleicos de la presente invención). En particular, el vector de expresión de la invención puede ser cualquier plásmido o vector conocido para el experto en la técnica que sea adecuado para expresar una proteína en una célula huésped particular incluyendo, pero sin limitarse a, células de mamífero, células bacterianas y células de levadura. Una construcción de expresión de la presente invención también puede ser un ácido nucleico que codifica una RT de la invención, y que se usa para posterior clonación en un vector respectivo para garantizar la expresión. Un vector adecuado se describe en los ejemplos y se ilustra en la figura 2. Los plásmidos y vectores para expresión de proteínas son bien conocidos en la técnica, y se pueden adquirir comercialmente de diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, Promega (Madison, WI, EE. UU.), Qiagen (Hilden, Alemania), Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.) o MoBiTec (Alemania). Los procedimientos de expresión de proteínas son bien conocidos para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2000 (Molecular Cloning: A laboratory manual, tercera edición).

El vector puede incluir adicionalmente secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula huésped, tal como un origen de replicación, uno o más genes terapéuticos y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica tales como elementos reguladores que dirigen la transcripción, traducción y/o secreción de la proteína codificada. El vector se puede usar para transducir, transformar o infectar una célula, provocando de este modo que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintos de los naturales para la célula. El vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada del ácido nucleico en la célula, tales como un recubrimiento de partícula vírica, liposoma, proteína o similar. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados son conocidos en la técnica para la expresión de proteínas, por técnicas de biología molecular estándar. Dichos vectores se seleccionan de tipos de vectores convencionales incluyendo insectos, por ejemplo, sistemas de expresión de baculovirus, o de expresión de levaduras, fúngicos, bacterianos o víricos. Otros vectores de expresión apropiados, de los que numerosos tipos son conocidos en la técnica, también se pueden

usar para este propósito. Los procedimientos para obtener dichos vectores de expresión son bien conocidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

Como se detalla anteriormente, el ácido nucleico que codifica una RT mutante de la invención se enlaza de forma funcional a una secuencia que es adecuada para dirigir la expresión de una proteína en una célula huésped, para garantizar la expresión de la proteína. Sin embargo, se engloba dentro de la presente invención que la construcción de expresión reivindicada puede representar un producto intermedio, que se clona posteriormente en un vector de expresión adecuado para garantizar la expresión de la proteína. El vector de expresión de la presente invención puede comprender además todo tipo de secuencias de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a, señales de poliadenilación, señales de donante de empalme y aceptor de empalme, secuencias intermedias, secuencias de potenciador transcripcionales, secuencias de potenciador traduccionales, gen(es) de resistencia a fármacos o similar. Opcionalmente, el gen de resistencia a fármacos se puede enlazar de forma funcional a un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que podría ser específico del ciclo celular o bien independiente del ciclo celular.

El término "enlazado de forma funcional" como se usa en el presente documento quiere decir en general que los elementos génicos se disponen de modo que funcionan en concierto para sus propósitos previstos, por ejemplo, ya que la transcripción se inicia por el promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica la proteína de la presente invención. Es decir, la ARN polimerasa transcribe la secuencia que codifica la proteína de fusión en ARNm, que a continuación se empalma y se traduce en una proteína.

El término "secuencia de promotor" como se usa en el contexto de la presente invención se refiere en general a cualquier tipo de secuencia de ADN reguladora enlazada de forma funcional a una secuencia codificante hacia 3', en la que dicho promotor se puede unir a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción del marco de lectura abierto codificado en una célula, dirigiendo de este modo la expresión de dicha secuencia codificante hacia 3'. La secuencia de promotor de la presente invención puede ser cualquier tipo de secuencia de promotor conocida para el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos del ciclo celular y promotores específicos del tipo celular.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende la RT mutante de la invención o el ácido nucleico de la invención. La célula es preferentemente una célula huésped. Una "célula huésped" de la presente invención puede ser cualquier tipo de organismo adecuado para su aplicación en tecnología de ADN recombinante, e incluye, pero no se limita a, todas las clases de cepas bacterianas y de levadura que son adecuadas para expresar una o más proteínas recombinantes. Los ejemplos de células huésped incluyen, por ejemplo, diversas cepas de *Bacillus subtilis* o *E. coli*. Una variedad de células huésped bacterianas de *E. coli* son conocidas para un experto en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, cepas tales como DH5-alfa, HB101, MV1190, JM109, JM101 o XL-1 blue que se pueden adquirir comercialmente de diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, Stratagene (CA, EE. UU.), Promega (WI, EE. UU.) o Qiagen (Hilden, Alemania). Una célula huésped en particular adecuada también se describe en los ejemplos, a saber células BL21(DE3) de *E. coli*. Las cepas de *Bacillus subtilis* que se pueden usar como célula huésped están disponibles comercialmente.

El cultivo de células huésped de acuerdo con la invención es un procedimiento rutinario conocido para el experto en la técnica. Es decir, un ácido nucleico que codifica una RT mutante de la invención se puede introducir en una célula(s) huésped adecuada(s) para producir la proteína respectiva por medios recombinantes. Estas células huésped pueden ser cualquier tipo de células adecuadas, preferentemente células bacterianas tales como *E. coli*, que se pueden cultivar fácilmente. En una primera etapa, este enfoque puede incluir la clonación del gen respectivo en un vector plasmídico adecuado. Los vectores plasmídicos se usan ampliamente para clonación génica y se pueden introducir fácilmente, es decir, transformar, en células bacterianas que se han hecho competentes. Después de que la proteína se haya expresado en la célula huésped respectiva, las células se pueden romper por medio de lisis celular química o bien mecánica, es bien conocido para el experto en la técnica, e incluye, pero no se limita a, por ejemplo, tratamiento con sal hipotónica, tratamiento con detergente, homogeneización o ultrasonificación.

La presente invención también proporciona un kit para realizar una retrotranscripción, que comprende la RT mutante de la presente invención. La retrotranscripción es la síntesis de ADN a partir de un molde de ARN, que normalmente está mediada por una transcriptasa inversa, y produce ADN complementario (ADNc). Las retrotranscriptasas usan un molde de ARN y un cebador corto complementario al extremo 3' del ARN para dirigir la síntesis de la primera hebra de ADNc, que se puede usar directamente como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta combinación de retrotranscripción y PCR (RT-PCR) permite la detección de ARN de baja abundancia en una muestra y la producción del correspondiente ADNc, facilitando de este modo la clonación de genes de bajas copias. De forma alternativa, la primera hebra de ADNc se puede hacer bicatenaria usando ADN polimerasa I y ADN ligasa. Estos productos de reacción se pueden usar para la clonación directa sin amplificación. En este caso, se requiere la actividad RNasa H, de la RT o bien suministrada de forma exógena. Dependiendo del uso previsto, el kit puede comprender además de la RT mutante de la invención otros componentes tales como un tampón, uno o más cebadores y una mezcla de dNTP. El kit también puede comprender agentes necesarios para otra reacción tales como agentes necesarios para PCR, síntesis de la segunda hebra de ADN o amplificación (por ejemplo, cebadores, sondas, polimerasa o marcadores). Además, el

kit puede comprender un manual de instrucciones.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la RT mutante de la presente invención para la síntesis de ADNc. Una técnica común usada para estudiar, por ejemplo, la expresión génica en células vivas es la de producir una copia de ADN (ADNc) del complemento celular de ARN. Esta técnica proporciona un medio para estudiar el ARN de células vivas que evita el análisis directo de ARN inherentemente inestable. Después del aislamiento de ARNm opcional (usando, por ejemplo, procedimientos tales como cromatografía de afinidad utilizando oligo dT), las secuencias de oligonucleótidos se hibridan típicamente a las moléculas de ARNm y las enzimas con actividad retrotranscriptasa se pueden usar para producir copias de ADNc de la secuencia de ARN, utilizando el cebador de ARN/ADN como molde. Por tanto, la retrotranscripción de ARNm es una etapa clave en muchas formas de análisis de expresión génica. Típicamente, el ARNm se retrotranscribe en ADNc para posterior análisis por extensión del cebador o reacción en cadena de la polimerasa. En el uso de la presente invención, el ARN se pone en contacto con una RT mutante de la presente invención y típicamente una secuencia de cebador que se hibrida a un molde de ARN para que la síntesis de ADN se inicie a partir del OH 3' del cebador. Se pueden seleccionar cebadores para que sean complementarios a, o sustancialmente complementarios a, las secuencias que se encuentran en el extremo 3' de cada hebra de la secuencia de ácido nucleico de interés. En un modo de realización ejemplar, se lleva a cabo una reacción de retrotranscripción usando una temperatura de hibridación en una reacción de retrotranscriptasa típicamente de aproximadamente 42 a 65 °C. La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo preferentemente a de aproximadamente 50 °C a 60 °C o de 60 °C a 65 °C.

La presente invención proporciona además un procedimiento para la retrotranscripción de ARN, comprendiendo el procedimiento sintetizar ADNc a partir del ARN con el uso de la RT mutante de la presente invención. El procedimiento se puede llevar a cabo como se detalla con respecto al uso de la RT mutante de la presente invención para la síntesis de ADNc.

Además, la presente invención proporciona además un procedimiento para detectar un marcador de ARN en una muestra,

a) poniendo en contacto la muestra con la RT mutante de la presente invención en condiciones que conducen a la actividad de la RT mutante;

b) sintetizando ADNc a partir del marcador de ARN con el uso de la RT mutante de la presente invención; y

c) detectando la presencia del ADNc sintetizado en la etapa b), detectando de este modo el marcador de ARN en la muestra.

El ARN se puede usar como marcador en diversas aplicaciones. El ARN detectado puede ser indicativo en sí mismo o puede ser indicativo de la presencia de ADN o la expresión de un gen de interés, que a su vez es indicativo de una enfermedad, presencia de un patógeno, etc. El propio ARN podría ser indicativo de la presencia de un ARN vírico, en particular un ARN retrovírico. Los retrovirus provocan una variedad de enfermedades tales como cáncer, sida, autoinmunidad y enfermedades del sistema nervioso central, huesos y articulaciones, tales como leucemia mielógena, leucemia eritroide, leucemia linfocítica, linfoma, sarcoma, carcinoma mamario, carcinoma renal, anemia aplásica, anemia hemolítica, enfermedad autoinmunitaria, inmunodeficiencia, osteopetrosis, artritis, neuropatía periférica, encefalopatía, neurodegeneración, demencia, neumonía y adenomatosis. Los virus que inducen dichas enfermedades incluyen virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus linfotrópico T humano (HTLV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus del tumor mamario murino (MMTV). Sin embargo, el marcador de ARN puede ser indicativo de expresión génica. Muchos genes se expresan en determinadas condiciones (incluyendo condiciones de enfermedad) o solo con especies particulares. En consecuencia, la presencia de una proteína (o el correspondiente ARNm) puede ser indicativa de un estado de enfermedad, célula o patógeno, por mencionar solo algunos. Como ejemplo, las células cancerosas se caracterizan por marcadores particulares, de las que sus ácidos nucleicos se pueden usar en la detección y cuantificación de los mismos. Los ejemplos que se pueden mencionar son: en especial oncogenes y genes supresores de tumores tales como p53, genes de la familia ras erb-B2, c-myc, mdm2, c-fos, DPC4, FAP, nm23, RET, WT1, y similares, LOH, por ejemplo con respecto a p53, DCC, APC, Rb y similares y también BRCA1 y BRCA2 en tumores hereditarios, inestabilidad de microsatélites de MSH2, MLH1, WT1 y similares; también ARN tumorales tales como CEA, citoqueratinas, por ejemplo, CK20, BCL-2, MUC1, en particular variantes de empalme específicas de tumor de los mismos, MAGE3, Muc18, tirosinasa, PSA, PSM, BA46, Mage-1 y similares, o también ARN morfogénicos tales como maspina, hCG, GIP, motilina, hTG, SCCA-1, AR, ER, PR, diversas hormonas y similares; además, en especial ARN y proteínas que afectan el perfil metastatizante, es decir, la expresión de moléculas involucradas en angiogénesis, motilidad, adhesión y degradación de matriz tales como bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R, tales como VEGF-R1 o VEGF -R2, E-cadherina, integrinas, selectinas, MMP, TIMP, SF, SF-R y similares, el perfil de ciclo celular o perfil de proliferación, tal como ciclinas (por ejemplo, proporción de expresión de ciclinas D, E y B), Ki67, p120, p21, PCNA y similares, o el perfil de apoptosis, tal como FAS (L+R), TNF (L+R), perforina, granzima B, BAX, bcl-2, caspasa 3 y similares. De forma alternativa, el ARN puede ser indicativo del ADN de un patógeno distinto de un retrovirus.

En una primera etapa del procedimiento, una muestra se pone en contacto con la RT mutante de la presente

invención en condiciones que conducen a la actividad de la RT mutante. Las condiciones adecuadas se detallan en el presente documento y son bien conocidas para el experto en la técnica. La muestra puesta en contacto puede ser cualquier muestra sospechosa de contener el ARN en cuestión, incluyendo una muestra de un sujeto. Una muestra es una cantidad limitada de material que está previsto que sea idéntica a y represente una cantidad mayor de ese/esos material(es). Se puede realizar un acto de obtener una muestra por una persona o automáticamente. Se pueden tomar o proporcionar muestras para pruebas, análisis, inspección, investigación, demostración o uso de prueba. A veces, el muestreo puede ser continuo. La muestra puede comprender o consistir en un sólido, un líquido o un gas; puede ser material de algunas características intermedias tales como gel o esputo, tejido, organismos o una combinación de estos. Preferentemente, la muestra es líquida o una suspensión que permite una fácil distribución.

Incluso si una muestra de material no se puede contar como elementos individuales, la cantidad de la muestra todavía puede ser descriptible en términos de su volumen, masa, tamaño u otras de dichas dimensiones. Una muestra sólida puede venir en una o algunas piezas discretas, o puede ser fragmentada, granular o en polvo.

La muestra en el presente contexto es una cantidad de material que se sospecha que contiene uno o más ácidos nucleicos que se van a detectar o medir y cuantificar. Como se usa en el presente documento, el término incluye, sin limitación, una muestra (por ejemplo, una biopsia o muestra médica), un cultivo (por ejemplo, cultivo microbiológico) o una muestra ambiental tal como agua o suelo. Las muestras pueden ser de un sujeto, tal como un animal o ser humano, pueden ser líquidas, sólidas (por ejemplo, heces), una suspensión o tejido. El término "muestra de un sujeto" incluye todos los líquidos biológicos, excreciones y tejidos aislados de cualquier sujeto dado. Preferentemente, el sujeto es un animal, más preferentemente un mamífero o todavía más preferentemente un ser humano. La muestra se puede obtener de todas las diversas familias de animales domésticos, así como animales asilvestrados o salvajes, incluyendo, pero sin limitarse a, animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc.

Como se detalla anteriormente, "muestra" quiere decir una cantidad de material que se sospecha que contiene un ácido nucleico de interés que se va a cuantificar. Como se usa en el presente documento, el término incluye una muestra (por ejemplo, una biopsia o una muestra médica) o un cultivo (por ejemplo, cultivo microbiológico). Las muestras pueden ser de una planta o animal, incluido ser humano, pueden ser fluidas, sólidas (por ejemplo, heces) o tejido. Las muestras pueden incluir materiales extraídos de un paciente incluyendo, pero sin limitarse a, cultivos, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados por aguja y similares. La muestra se puede obtener de todas las diversas familias de animales domésticos, así como animales asilvestrados o salvajes, incluyendo, pero sin limitarse a, animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc. Con respecto a una muestra humana o "muestra tisular" o "muestra de paciente" o "muestra tisular o celular de paciente" o "muestra", cada una quiere decir un grupo de células similares o compuestos biológicos o bioquímicos obtenidos de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra tisular puede ser un tejido sólido como de una muestra o biopsia o aspirado de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualquier componente sanguíneo; líquidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra tisular puede contener compuestos que no se entremezclan de forma natural con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Los ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, cultivos tisulares o celulares, sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, aspirado por aguja, orina, semen, líquido seminal, plasma seminal, líquido prostático, excrementos, lágrimas, saliva, sudor, biopsia, ascitis, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido amniótico, líquido peritoneal, líquido intersticial, esputo, leche, linfa, bronquiales y otras muestras de lavado, o muestras de extractos tisulares. La fuente de la muestra puede ser tejido sólido como el de una muestra o biopsia o aspirado de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado; o células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto. En un modo de realización preferente del procedimiento, la muestra se selecciona del grupo que consiste en un líquido corporal, sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, un hisopo, una muestra clínica, una muestra de órgano y una muestra tisular, en particular un ser humano, un animal o una planta, en especial un ser humano. De forma alternativa o adicionalmente, la muestra se ha obtenido de un cultivo celular, una fuente sospechosa de estar contaminada o un sujeto, en particular en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en un ser humano, un animal y una planta, en especial un ser humano.

Después de la etapa a), el ADNc se sintetiza a partir del marcador de ARN con el uso de la RT mutante de la presente invención. Los detalles en esta etapa se dan anteriormente. Después de esto, se detecta la presencia del ADNc sintetizado, detectando de este modo el marcador de ARN en la muestra. Los procedimientos para detectar ADN son bien conocidos en la técnica e incluyen procedimientos de PCR, uso de sondas específicas con marcadores (por ejemplo, radioactivos o fluorescentes) o agentes intercalantes. En un modo de realización preferente, se usa retrotranscriptasa en combinación con PCR ultrarrápida para la detección del marcador de ARN.

Los procedimientos y usos de la invención son de particular interés en el campo médico tal como en diagnóstico o en seguimiento terapéutico, y se pueden usar para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico de interés indicativo de un microorganismo, célula, virus, bacteria, hongo, especie de mamífero, estado genético o enfermedad

específicos. De acuerdo con esto, los procedimientos se pueden usar en la detección de un patógeno. Un patógeno tiene el potencial para provocar una enfermedad. Típicamente, el patógeno se usa para describir un agente infeccioso tal como un virus, bacteria, prión, un hongo o incluso otro microorganismo. Por supuesto, los procedimientos de la invención también se pueden usar para detectar microorganismos no patógenos. En consecuencia, en otro modo de realización preferente del procedimiento, el marcador de ARN es indicativo de un microorganismo, una célula, un virus, una bacteria, un hongo, una especie de mamífero, un estado genético o una enfermedad.

Los patógenos ejemplares incluyen sin limitación:

- bacterianos: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Chlamydomphila*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Listeria*, *Francisella*, *Legionella* y *Yersinia*
- víricos: adenovirus, herpes simple, virus de la varicela-zóster, citomegalovirus, papilomavirus, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, poliovirus, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo occidental, virus TBE, VIH, virus de la gripe, virus de Lassa, rotavirus y Virus del Ébola
- fúngicos: *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* y *Stachybotrys*
- parásitos: parásitos protozoicos, parásitos helmínticos y parásitos artrópodos

Es evidente que la detección fiable y opcionalmente la cuantificación de un patógeno pueden ser de alta relevancia en el diagnóstico de la presencia y gravedad de una enfermedad.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica en el campo de la invención. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1 -56081 -569-8).

La invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento porque pueden variar. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica de la presente invención, los procedimientos y materiales preferentes se describen en el presente documento. Además, la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo modos de realización particulares y no está previsto que limite el alcance de la presente invención.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, las palabras "comprender", "contener" y "englobar" se deben interpretar de forma inclusiva en lugar de exclusiva. De forma similar, la palabra "o" está previsto que incluya "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. El término "pluralidad" se refiere a dos o más.

Está previsto que las siguientes figuras y ejemplos ilustren diversos modos de realización de la invención. Como tales, las modificaciones específicas analizadas no se deben interpretar como limitaciones en el alcance de la invención. Será evidente para el experto en la técnica que se pueden realizar diversos equivalentes, cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención, y por tanto se debe entender que dichos modos de realización equivalentes se deben incluir en el presente documento.

Figuras

Figura 1: secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la RT mutante MM3.14. Se indican las seis mutaciones obligatorias (sustituciones A32V, L72R, E286R, E302K, W388R y L435R) con respecto a la natural.

Figura 2: plásmidos de expresión para RT MMLV. El asterisco indica el codón finalizador.

Figura 3: actividad y estabilidad de variantes individuales. (A) Actividad específica. La reacción de incorporación de dTTP se llevó a cabo a 37 °C. Una unidad se define como la cantidad que incorpora 1 nmol de dTTP en poli(rA)-p(dT)₁₅ en 10 min. La actividad específica relativa se define como la proporción de la actividad específica de la variante con respecto a la WT. (B, C) Estabilidad térmica. La RT a 100 nM se incubó a 46 °C (B) o 49 °C (C) en presencia de poli(rA)-p(dT)₁₅ (28 μM) durante 10 min. A continuación, la reacción de incorporación de dTTP se llevó a cabo a 37 °C. La actividad relativa se define como la proporción de la tasa de reacción inicial de RT con la

incubación de 10 min a 46 o 49 °C con respecto a sin la incubación.

Figura 4: actividad y estabilidad de variantes múltiples. (A, B) Actividad específica. (A) La reacción de incorporación de dTTP se llevó a cabo a RT 5 nM a 37 °C. Una unidad se define como la cantidad que incorpora 1 nmol de dTTP en poli(rA)-p(dT)₁₅ en 10 min. La actividad específica relativa se define como la proporción de la actividad específica de la variante con respecto a la WT. (B) La reacción de incorporación de PicoGreen se llevó a cabo a RT 5 nM a 37 °C. Las tasas de reacción iniciales ($\Delta F/\text{min}$) se calcularon y se normalizaron con la de WT como 1,0. (C-F) Estabilidad térmica. La RT a 100 nM se incubó a 49 o 51 °C en presencia de poli(rA)-p(dT)₁₅ (28 μM) durante 10 min. A continuación, la reacción de incorporación de dTTP (C, E) o la reacción de incorporación de PicoGreen (D, F) se llevó a cabo a RT 10 nM a 37 °C. La actividad relativa se define como la proporción de la tasa de reacción inicial de RT con el tratamiento térmico de 10 min con respecto a sin él.

Figura 5: dependencia de la temperatura en la síntesis de ADNc por WT, MM3 o MM3.14. La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo a 50 (A), 55 (B, C), 60 (D) o 65 °C (E) durante 10 min usando la RT que había recibido incubación térmica a 55 °C durante 5 min (B) o la RT sin incubación térmica (A, C-E). A continuación, se llevó a cabo la PCR. Se mostró la fluorescencia de la PCR ultrarrápida usando productos de síntesis de ADNc. Los puntos de cruce (CP) fueron 28,01, 25,22 y 25,67 min para WT, MM3 y MM3.14, respectivamente (A), 24,95 y 26,74 min para MM3 y MM3.14, respectivamente (B), 30,52 min para MM3.14 (C), 28,48 y 29,14 min para MM3 y MM3.14, respectivamente (D), y 32,51 min para MM3.14 (E).

Figura 6: estabilidad de WT, MM3 o MM3.14 como se evalúa por síntesis de ADNc. La RT a 100 nM se incubó a 48, 54, 57, 60 o 63 °C en presencia de poli(rA)-p(dT)₁₅ (28 μM) durante 10 min. A continuación, la síntesis de ADNc se llevó a cabo con 16 pg de ARN de *cesA*, cebador RV-R26 0,5 μM a 45 °C durante 30 min. La PCR se llevó a cabo con una combinación de cebadores de RV y F5. Los productos amplificados se aplicaron a gel de agarosa al 1 % seguido de tinción con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Ejemplos

Procedimientos

Concentración de RT y ARN estándar

La concentración de RT se determinó de acuerdo con el procedimiento de Bradford (Bradford, 1976) usando una solución de CBB de ensayo de proteínas (Nacalai Tesque, Kioto, Japón) con seroalbúmina bovina (Nacalai Tesque) como estándar. Se preparó ARN estándar, que fue un ARN de 1014 nucleótidos correspondiente a la secuencia de ADN 8353-9366 del gen *cesA* de *Bacillus cereus* (número de acceso de GenBank DQ360825), por transcripción *in vitro*.

Construcción de plásmidos

Los plásmidos de expresión de variantes de RT MMLV se construyeron por mutagénesis dirigida a sitio usando el plásmido de expresión para RT MMLV natural, pET-MRTHis (fig. 2), o la variante termoestable MM3, pET-MM3, como molde y una BL21(DE3) de *E. coli* [*F*, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B⁻* *m_B⁻*) *gal dcm* (DE3)] como huésped. Se verificaron las secuencias de nucleótidos de los genes de RT MMLV mutados.

Expresión y purificación de variantes de RT MMLV individuales

Tres ml de caldo L que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina se inocularon con la reserva de glicerol de la BL21 transformada (DE3) y se incubaron durante 16 h con agitación a 30 °C. La expresión del gen de RT se indujo por el sistema de autoinducción (Novagen, Darmstadt, Alemania). La RT MMLV se purificó del medio de cultivo usando el sistema de purificación de proteínas HisLink Spin (Promega, Madison, WI). En resumen, las células bacterianas se rompieron por el reactivo de lisis celular FastBreak, seguido de la adición de resina purificadora de proteínas HisLink al cultivo. A continuación, las muestras se transfirieron a la columna de centrifugación HisLink donde se separó por lavado la proteína no unida. La RT MMLV se recuperó por la elución con 0,2 ml de tampón HEPES-NaOH 100 mM (pH 7,5), imidazol 500 mM. La fracción activa se desaló usando columnas de filtración en gel PD-10 prerrellenadas (GE Healthcare) equilibradas con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 200 mM, glicerol al 50 % y se almacenó a -80 °C.

Expresión y purificación de variantes de RT MMLV múltiples

El cultivo durante la noche de los transformantes (5 ml) se añadió a 500 ml de caldo L que contenía ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó con agitación a 37 °C. Cuando la DO_{660} alcanzó 0,6-0,8, se añadieron 0,15 ml de IPTG 0,5 M y se continuó el cultivo a 30 °C durante 3 h. Después de la centrifugación a 10.000 x *g* durante 5 min, se obtuvieron las células, se suspendieron con 10 ml de tampón fosfato de potasio 0,02 M (pH 7,2), ditiotritol (DTT) 2,0 mM, glicerol al 10 % (tampón A) que contiene fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10 mM (PMSF), pH 7,5 y se rompieron por sonicación. Después de la centrifugación a 20.000 x *g* durante 40 min, se recogió el sobrenadante

y se aplicó a una columna [25 mm (diámetro interno) x 120 mm] rellena con gel Toyopearl DEAE-650M (Tosoh, Tokio, Japón) equilibrada con tampón A. Después del lavado con tampón A que contiene NaCl 120 mM, la RT unida se eluyó con tampón A que contiene NaCl 300 mM. Se añadió (NH₄)₂SO₄ sólido al eluido (30 ml) hasta una concentración final de saturación al 40 %. La solución se agitó durante 5 min y se dejó durante 30 min en hielo.

Después de la centrifugación a 20.000 x g durante 30 min a 4 °C, el sedimento se recogió y se disolvió en 10 ml de tampón A que contiene NaCl 100 mM. La solución se aplicó a la columna rellena con Ni²⁺-sefrosa (HisTrap HP 1 ml, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 200 mM, DTT 2 mM, glicerol al 10 % (tampón B). Después del lavado con tampón B que contiene imidazol 50 mM, la RT unida se eluyó con tampón B que contiene imidazol 500 mM. La fracción activa se desaló usando columnas de filtración en gel PD-10 prerrellenas equilibradas con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 200 mM, glicerol al 50 % y se almacenó a -80 °C.

SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras. Las proteínas se redujeron por tratamiento con un 2,5 % de 2-mercaptoetanol a 100 °C durante 10 min y a continuación se aplicaron sobre el gel. Se aplicó una corriente constante de 40 mA durante 40 min. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250. El kit marcador de masa molecular que consiste en fosforilasa B de músculo de conejo (97,2 kDa), seroalbúmina bovina (66,4 kDa), ovalbúmina de clara de huevo de gallina (44,3 kDa) y anhidrasa carbónica bovina (29,0 kDa) fue un producto de Takara Bio Inc (Otsu, Japón).

Ensayo de retrotranscripción usando [³H]-dTTP

Se preparó poli(rA)-p(dT)₁₅ hibridando (dT)₁₅ (Fasmac, Tokio, Japón) y poli(rA) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). La reacción se llevó a cabo en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, DTT 2 mM, MgCl₂ 5 mM, poli(rA)-p(dT)₁₅ 25 µM (esta concentración se expresa en base a p(dT)₁₅), [³H]dTTP 0,2 mM (1,85 Bq/pmol) (GE Healthcare), y RT MMLV 5 o 10 nM a 37 °C. Se tomó una alícuota (20 µl) de la mezcla de reacción a 3 y 6 min y de inmediato se colocó sobre el filtro de vidrio. Se retiró [³H]dTTP no incorporado por tres lavados de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % (p/v) enfriado durante 10 min cada uno, seguido de un lavado con etanol al 95 % enfriado. La radioactividad retenida en los filtros secos se contó en 2,5 ml de Ecoscint H (National Diagnostics, Yorkshire, Reino Unido). La tasa de reacción inicial se estimó a partir de la evolución temporal para la incorporación de [³H]dTTP.

Ensayo de retrotranscripción usando tinte fluorescente PicoGreen

Se usó el kit de ensayo de retrotranscriptasa EnzChek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se diluyó tampón 20xTE (1 ml) añadiendo 19 ml de agua para preparar tampón 1xTE. Se diluyó el reactivo de cuantificación de ADNbc PicoGreen (50 µl) añadiendo 17,5 ml de tampón 1xTE para preparar la solución PicoGreen. Poli(rA)-p(dT)₁₆ para su uso en inactivación térmica se preparó como sigue: poli(rA) (3 µl de 1 mg/ml en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,1), EDTA 0,5 mM; alrededor de 350 base) y p(dT)₁₆ (3 µl de 50 µg/ml en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,1), EDTA 0,5 mM) se mezclaron y se dejaron durante 1 h a temperatura ambiente seguido de la dilución con 114 µl de PDGT (tampón fosfato de potasio 0,01 M (pH 7,6), DTT 2 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 0,2 %). RT MMLV (8 µl de 500 nM), poli(rA)-p(dT)₁₆ (8 µl) y PDGT (64 µl) se mezclaron para preparar la concentración de RT MMLV 50 nM. La solución resultante (40 µl de 80 µl) se incubó a 49 o 51 °C durante 10 min, seguido de la incubación en hielo durante 30 min.

Poli(rA)-p(dT)₁₆ para su uso en el ensayo de retrotranscripción se preparó como sigue: poli(rA) (5 µl) y p(dT)₁₆ (5 µl) se mezclaron y se dejaron durante 1 h a temperatura ambiente seguido de la dilución con 2 ml de tampón de polimerización (tampón Tris-HCl 60 mM (pH 8,1), KCl 60 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 13 mM, dTTP 100 mM). Poli(rA)-p(dT)₁₆ (96 µl) y 40 µl de RT MMLV 25 o 50 nM, expuestos o no al tratamiento térmico, se incubaron a 37 °C durante 10 min. La reacción se inició añadiendo la solución de RT MMLV preincubada (24 µl) a la solución de poli(rA)-p(dT)₁₆ preincubada (96 µl). Se tomó una alícuota (25 µl) de la mezcla de reacción a 2,5, 5,0, 7,5 y 10 min, a la que se le añadieron de inmediato 2 µl de EDTA 200 mM, seguido de la incubación en hielo durante 30 min o más. La solución en blanco se preparó mezclando solución de poli(rA)-p(dT)₁₆ (20 µl) y EDTA 200 mM (2 µl) seguido de la adición de solución RT MMLV (5 µl). A cada solución (27 µl) se le añadió solución de PicoGreen (173 µl). Los tubos se envolvieron con papel de aluminio y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min. La fluorescencia a 523 nm se midió con EnSight (Perkin Elmer) con la longitud de onda de excitación de 502 nm.

Síntesis de ADNc

Se preparó ARN estándar, que es un ARN de 1.014 nucleótidos correspondiente a la secuencia de ADN 8.353-9.366 del gen *cesA* de *Bacillus cereus* (número de acceso de GenBank DQ360825), por transcripción *in vitro*. La mezcla de reacción para la síntesis de ADNc (20 µl) se preparó mezclando agua (12 µl), tampón 10xRT (tampón Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 500 mM, DTT 20 mM, MgCl₂ 50 mM) (2 µl), dNTP 2,0 mM (1 µl), 160 pg/µl de ARN de *cesA* (2 µl), cebador RV-R26 10 pM 5'-TGTGGAATTGTGAGCGGTGTCGCAATCACCGTAACACGACGTAG-3' (SEQ ID NO: 4) (1 µl) y RT MMLV WT 10 nM (2 µl). La reacción se llevó a cabo a 45 °C durante 30 min y 65 °C

durante 5 min. La mezcla de reacción para PCR (25 µl) se preparó mezclando el producto de reacción de síntesis de ADNc (2 µl), agua (17,7 µl), tampón 10xPCR (2,5 µl), dNTP 2 mM (1,5 µl), cebador F5 10 µM 5'-TGCGCGCAAAATGGGTATCAC-3' (SEQ ID NO: 5) (0,5 µl) y cebador RV 10 µM 5'-TGTGGAATTGTGAGCGG-3' (SEQ ID NO: 6) (0,5 µl) y *Taq polimerasa* (0,3 µl). La reacción se llevó a cabo en 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 60 s a 72 °C. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1,0 % p/v y se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml).

Ejemplo 1: diseño de mutaciones y caracterización de variantes individuales

Se genera previamente una variante de RT MMLV termoestable triple MM3 (E286R/E302K/L435R) introduciendo cargas positivas en posiciones que se han implicado en la interacción con un molde-cebador (Yasukawa *et al.*, 2010). Para estabilizar además la RT MMLV, se diseñan 29 mutaciones (tabla 1). Son 8 mutaciones destinadas a estabilizar el núcleo hidrófobo, 8 mutaciones destinadas a introducir puente salino, 10 mutaciones destinadas a introducir carga superficial y tres mutaciones destinadas a evitar el enlace disulfuro.

Tabla 1. Mutaciones diseñadas

Mutación	Objetivo
Ala32→Val	Estabilizar núcleo hidrófobo
Leu41→Asp	Introducir puente salino
Ala42→Val	Estabilizar núcleo hidrófobo
Val43→Glu	Incrementar carga superficial
Gln63→Glu	Introducir puente salino
Leu72→Arg	Incrementar carga superficial
Cys90→Ser	Evitar enlaces disulfuro
Val118→Ile	Estabilizar núcleo hidrófobo
Tyr146→Phe	Estabilizar núcleo hidrófobo
Ala154→Ile	Estabilizar núcleo hidrófobo
Met177→Arg	Incrementar carga superficial
Ile179→Arg	Incrementar carga superficial
Ile212→Arg	Incrementar carga superficial
Leu234→Arg	Incrementar carga superficial
Ile261→Phe	Estabilizar núcleo hidrófobo
Cys262→Ser	Evitar enlaces disulfuro
Leu272→Glu	Introducir puente salino
Met289→Arg	Incrementar carga superficial
Cys310→Leu	Estabilizar núcleo hidrófobo
Trp336→Arg	Introducir puente salino
Ile347→Glu	Introducir puente salino
Leu351→Glu	Incrementar carga superficial
Leu357→Asp	Introducir puente salino
Asp361→Leu	Estabilizar núcleo hidrófobo
Leu368→Arg	Incrementar carga superficial
Val370→Glu	Introducir puente salino
Trp388→Arg	Introducir puente salino
Cys409→Arg	Evitar enlaces disulfuro
Leu410→Arg	Incrementar carga superficial

La RT MMLV natural (WT), las 29 variantes individuales y una variante doble Y146F/D361L se expresaron en un cultivo de 3 ml y se purificaron a partir de las células. También se preparó una variante cuádruple termoestable MM4 (E286R/E302K/L435R/D524A) (Yasukawa *et al.*, 2010). MM4 carece de actividad RNasa H porque Asp524 es un residuo catalítico para la actividad RNasa H. Después de SDS-PAGE en condiciones reductoras, la WT purificada y las variantes proporcionaron una única banda con una masa molecular de 75 kDa.

La figura 3A muestra las actividades específicas de la reacción de retrotranscripción para WT y las 30 variantes. La actividad específica de WT fue de 14.000 unidades/mg. Todas las variantes se pueden clasificar en tres grupos. El grupo 1 comprende V43E, A154I, I261F, L357D, L368R y V370E con actividades específicas que fueron menos de un 10 % de la de WT. El grupo 2 comprende L41D, Q63E, L72R, L272E W388R y L410R con actividades específicas que fueron de un 60-140 % de la de WT. El grupo 3 comprende las otras 18 variantes con actividades específicas que fueron de un 10-60 % de la de WT.

Las figuras 3B y C muestran las estabildades de WT, MM4 y las 24 variantes que pertenecen al grupo 2 o 3 a 49 y 51 °C, respectivamente. La actividad relativa se definió como la proporción de la tasa de reacción inicial para una incubación de 10 min a 49 o 51 °C en presencia de T/P con respecto a la tasa sin incubación. Las actividades relativas de WT y D524A a 49 °C fueron de un 66 y 120 %, respectivamente, y las de 51 °C fueron de un 18 y 100 %, respectivamente. Ninguna variante presentó mayor actividad relativa que MM4 a 49 o 51 °C. Sin embargo, A32V, L72R, I212R, L272E, W388R y C409R presentaron mayor actividad relativa que WT tanto a 49 como a 51 °C.

Ejemplo 2: diseño de combinación mutacional y caracterización de variantes múltiples

En base a los resultados presentados en la fig. 3, se seleccionaron cuatro mutaciones (Ala32→Val, Leu72→Arg, Ile212→Arg, Leu272→Glu y Trp388→Arg) como mutaciones estabilizantes y se seleccionó una mutación (Leu41→Asp) como mutación activadora. Se diseñaron diez variantes (MM3.1-MM3.10) combinando una, dos o tres de las seis mutaciones con las mutaciones MM3 (Glu286→Arg, Glu302→Lys y Leu435→Arg) (tabla 2).

Tabla 2. Variantes múltiples

Variante	Mutaciones
MM3	E286R/E302K/L435R
MM3.1	E286R/E302K/W388R/L435R
MM3.2	L272E/E286R/E302K/L435R
MM3.3	A32V/E286R/E302K/L435R
MM3.4	L72R/E286R/E302K/L435R
MM3.5	I212R/E286R/E302K/L435R
MM3.6	L41D/E286R/E302K/L435R
MM3.7	I212R/E286R/E302K/W388R/L435R
MM3.8	L72R/E286R/E302K/W388R/L435R
MM3.9	L72R/I212R/E286K/E302R/L435R
MM3.10	L72R/I212R/E286R/E302K/W388R/L435R
MM3.11	A32V/L72R/E286R/E302K/L435R
MM3.12	A32V/I212R/E286R/E302K/L435R
MM3.13	A32V/I212R/E286R/E302K/W388R/L435R
MM3.14	A32V/L72R/E286R/E302K/W388R/L435R
MM3.15	A32V/L72R/I212R/E286R/E302K/W388R/L435R

Se expresaron en *E. coli* y se purificaron. Tras SDS-PAGE en condiciones reductoras, las variantes purificadas proporcionaron una única banda con una masa molecular de 75 kDa. Los rendimientos de las enzimas purificadas de 500 ml de cultivo estuvieron en el intervalo de 0,38-4,26 mg, que fueron comparables al de la WT (2,27 mg) (tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento, actividad y estabilidad de variantes de RT MMLV por el ensayo usando [³H]-dTTP

Variante	Rendimientos de 500 ml de cultivo (mg)	Actividad específica ^a (unidades/mg)
WT	2,27	139.000(1,0) ^b
MM3	4,26	92.000 (0,66) ^b
MM3.1	0,38	39.000 (0,28) ^b
MM3.2	3,24	0 (0) ^b

MM3.3	2,97	53.000 (0,38) ^b
MM3.4	2,30	80.000 (0,58) ^b
MM3.5	2,45	112.000 (0,81) ^b
MM3.6	2,22	103.000 (0,74) ^b
MM3.7	1,64	147.000 (1,1) ^b
MM3.8	2,65	84.000 (0,60) ^b
MM3.9	2,99	80.000 (0,58) ^b
MM3.10	2,23	60.000 (0,43) ^b

^aLa reacción se llevó a cabo en RT 5 nM, tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, DTT 2 mM, MgCl₂ 5 mM, poli(rA)-p(dT)₁₅ 25 µM (esta concentración se expresa en base a p(dT)₁₅) y [³H]dTTP 0,2 mM a 37 °C. Una unidad se define como la cantidad que incorpora 1 nmol de dTTP en poli(rA)-p(dT)₁₅ en 10 min.

^bLos números en paréntesis indican valores relativos a WT (natural).

La figura 4A y tabla 3 muestran las actividades por el ensayo de retrotranscripción usando [³H]-dTTP. Se evaluaron las estabildades por el ensayo usando tinte fluorescente PicoGreen. MM3.2 (L272E/E286R/E302K/L435R) carecía de actividad, lo que indica que la mutación de Leu272→Glu fue incompatible con las mutaciones MM3. Las actividades específicas de las otras nueve variantes (MM3.1 y MM3.3-MM3.10) fueron de un 30-100 % de la de la WT.

Tabla 4. Estabilidad de variantes de RT MMLV por el ensayo usando [³H]-dTTP.

Tasa de reacción inicial (nM/s)				
	Antes de tratamiento térmico ³	Después de tratamiento térmico (49 °C) ^b	Antes de tratamiento térmico	Después de tratamiento térmico (51 °C) ^b
WT	70,8	5,8 (0,08) ^c	70,5	0,7 (0,0) ^c
MM3	92,4	48,8 (0,53) ^c	78,8	20,9 (0,27) ^c
MM3.1	33,1	10,7 (0,32) ^c	NT ^d	NT ^d
MM3.2	NT ^d	NT ^d	NT ^d	NT ^d
MM3.3	47,8	36,4 (0,76) ^c	46,2	17,6 (0,38) ^c
MM3.4	96,3	36,5 (0,38) ^c	NT ^d	NT ^d
MM3.5	64,9	40,7 (0,63) ^c	120,7	49,4 (0,41) ^c
MM3.6	60,0	8,9 (0,15) ^c	NT ^d	NT ^d
MM3.7	87,3	63,7 (0,73) ^c	71,9	55,3 (0,77) ^c
MM3.8	73,7	65,9 (0,89) ^c	60,8	38,3 (0,63) ^c
MM3.9	83,0	58,9 (0,71) ^c	47,1	14,0 (0,30) ^c
MM3.10	70,3	67,9 (0,97) ^c	41,2	18,7 (0,45) ^c

^aLa reacción se llevó a cabo en RT 10 nM, tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, DTT 2 mM, MgCl₂ 5 mM, poli(rA)-p(dT)₁₅ 25 µM (esta concentración se expresa en base a p(dT)₁₅) y [³H]dTTP 0,2 mM a 37 °C. Una unidad se define como la cantidad que incorpora 1 nmol de dTTP en poli(rA)-p(dT)₁₅ en 10 min.

^bLa RT a 100 nM se incubó a 49 o 51 °C en ausencia o presencia de poli(rA)-p(dT)₁₅ (28 µM) durante 10 min. A continuación, se llevó a cabo la reacción de incorporación de dTTP a 37 °C.

^cLos números entre paréntesis indican la actividad relativa, que se define como la proporción de la tasa de reacción inicial con incubación con respecto a sin incubación.

^dNo sometido a prueba

La figura 4C y tabla 4 muestran las estabildades como se evalúan por el ensayo usando [³H]-dTTP, y la figura 4D muestra las estabildades como se evalúan por el ensayo usando PicoGreen. Las actividades relativas de MM3.3 MM3.5, MM3.7, MM3.8, MM3.9 y MM3.10 fueron comparables a las de MM3 mientras que las de MM3.1, MM3.4 y MM3.6 fueron menores que MM3. La actividad relativa de MM3.6 (L41D/E286R/E302K/L435R) fue casi la misma

que la de la WT, lo que indica que la mutación de Leu41→Asp fue incompatible con las mutaciones MM3.

Adicionalmente, se diseñaron cinco variantes (MM3.11-MM3.15; véase la tabla 2) combinando dos o más de las cuatro mutaciones (Ala32→Val, Leu72→Arg, Ile212→Arg y Trp388→Arg). MM3.11 no se expresó, pero las otras cuatro variantes (MM3.12-MM3.15) se expresaron en *E. coli* y se purificaron. Las figuras 4E y 4F muestran sus estabildades como se evalúan por el ensayo usando [³H]-dTTP y PicoGreen, respectivamente. La actividad relativa de MM3.14 fue superior a la de MM3, mientras que las de MM3.12, MM3.13 y MM3.15 fueron menores que MM3.

Se evaluó además MM3.14. La figura 5 muestra la dependencia de la temperatura sobre la síntesis de ADNc por WT, MM3 o MM3.14. Después de la reacción de síntesis de ADNc, se llevó a cabo una PCR ultrarrápida. Cuando se realizó la reacción de síntesis de ADNc con MM3.14 a 55, 60 o 65 °C durante 10 min, se incrementó la fluorescencia en la PCR. Por otra parte, cuando se realizó la reacción de síntesis de ADNc con WT o MM3, no fue así. Esto indica que MM3.14 fue más termoestable y más adecuada para su uso en la síntesis de ADNc que MM3.

La figura 6 muestra la comparación de las termoestabilidades de WT, MM3 y MM3.14. La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo a 45 °C durante 30 min con WT, MM3 o MM3.14 expuestas a 48-63 °C durante 10 min. El producto de reacción se sometió a PCR, seguido de electroforesis en gel de agarosa. Las temperaturas más altas a las que se sintetizó ADNc fueron 60 °C para MM3.

En otro experimento se comprobó que se sintetizó ADNc a 60 y 65 °C en la reacción con MM3.14 (A32V/L72R/E286R/E302K/W388R/L435R), mientras que se sintetizó poco a 60 °C y no se sintetizó a 65 °C en la reacción con MM3 (E286R/E302K/L435R), lo que indica que MM3.14 es más termoestable que MM3 en la reacción.

En resumen, se pudo comprobar que MM3.14 es más termoestable que MM3.

Referencias

Arezi,B. y Hogrefe,FI. (2009) *Nucleic Acids Res.*, 37, 473-481.

Baranauskas,A., Paliksa,S., Alzbutas,G., Vaitkevicius,M., Lubiene,J., Letukiene,V., Burinskas,S., Sasnauskas,G. y Skirgaila,R. (2012) *Protein Eng. Des. Sel.*, 25, 657-668.

Bradford, M.M. (1976) *Anal Biochem.*, 72, 248-254

Gerard,G.F., Potter,R.J., Smith,M.D., Rosenthal,K., Dhariwal,G., Lee,J. y Chatterjee,D.K. (2002) *Nucleic Acids Res.*, 30, 3118-3129

Konishi,A., Ma,X. y Yasukawa,K. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 147-150.

Kotewicz,M.L., D'Alessio,J.M., Driftmier,K.M., Blodgett,K.P. y Gerard,G.F. (1985) *Gene*, 35, 249-258.

Mizuno,M., Yasukawa,K. y Inouye,K. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 440-442.

Shoichet,B.K., Baase,W.A., Kuroki,R. y Matthews,B.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 452-456.

Yasukawa,K., Mizuno,M., Konishi,A. y Inouye,K. (2010) *J. Biotechnol.*, 150, 299-306.

REIVINDICACIONES

1. Una retrotranscriptasa (RT) mutante con un incremento en la estabilidad térmica con respecto a la RT natural de SEQ ID NO: 1, comprendiendo la RT mutante

i) una secuencia de aminoácidos que tiene seis sustituciones aminoacídicas con respecto a la RT natural de SEQ ID NO: 1, en la que

- Ala en la posición 32 se sustituye con Val (A32V);
- Leu en la posición 72 se sustituye con Arg (L72R);
- Glu en la posición 286 se sustituye con Arg (E286R);
- Glu en la posición 302 se sustituye con Lys (E302K);
- Trp en la posición 388 se sustituye con Arg (W388R); y
- Leu en la posición 435 se sustituye con Arg (L435R), o

ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de i) y tiene las seis sustituciones aminoacídicas como se define en i),

en la que la RT mutante presenta actividad retrotranscriptasa y en la que la RT mutante tiene un incremento en la estabilidad térmica con respecto a la MM3 mutante, en la que MM3 tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de SEQ ID NO: 1 solo en tres sustituciones aminoacídicas, en la que Glu en la posición 286 se sustituye con Arg (E286R), Glu en la posición 302 se sustituye con Lys (E302K) y Leu en la posición 435 se sustituye con Arg (L435R).

2. La RT mutante de la reivindicación 1, en la que la RT mutante difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 adicionalmente por la delección de como máximo cinco aminoácidos en el extremo N de SEQ ID NO: 1 y/o por la delección de como máximo cinco aminoácidos en el extremo C de SEQ ID NO: 1.

3. La RT mutante de la reivindicación 1 o 2, en la que la RT mutante comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 96 %, 97 %, 98 % o un 99 %, en particular un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

4. La mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la estabilidad térmica se determina midiendo la actividad retrotranscriptasa de la mutante medida después de tratamiento térmico, en particular después de incubación a 60 °C durante 10 min.

5. La mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la estabilidad térmica se incrementa en al menos un 10 %, 20 %, 30 % o 40 %, preferentemente al menos un 50 % con respecto a la natural o MM3 mutante.

6. La mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la actividad retrotranscriptasa de la RT mutante es al menos un 50 % de la actividad retrotranscriptasa de la natural, en particular al menos un 60 %, más en particular al menos un 70 %, en especial al menos un 80 % y/o en la que la actividad retrotranscriptasa se determina por incorporación de dTTP mediada por RT a 37 °C.

7. La RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 fusionada con otra proteína.

8. Un ácido nucleico que codifica la RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Una célula que comprende la RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. Un kit para realizar una retrotranscripción, que comprende la RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Uso de la RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la síntesis de ADNc.

12. Un procedimiento para la retrotranscripción de ARN, comprendiendo el procedimiento sintetizar ADNc a partir del ARN con el uso de la RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

13. Un procedimiento para detectar un marcador de ARN en una muestra,

- a) poniendo en contacto la muestra con la RT mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en condiciones que conducen a la actividad de la RT mutante;
- 5 b) sintetizando ADNc a partir del marcador de ARN con el uso de la RT mutante; y
- c) detectando la presencia del ADNc sintetizado en la etapa b), detectando de este modo el marcador de ARN en la muestra.
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en un líquido corporal, sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, un hisopo, una muestra clínica, una muestra de órgano y una muestra tisular y/o en el que la muestra se ha obtenido de un cultivo celular, una fuente sospechosa de estar contaminada o un sujeto, en particular en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en un ser humano, un animal y una planta, en especial un ser humano.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14, en el que el marcador de ARN es indicativo de un microorganismo, una célula, un virus, una bacteria, un hongo, una especie de mamífero, un estado genético o una enfermedad.

ES 2 880 366 T3

1	accctaaatatagaagatgagcatcggtacatgagacctcaaaagagccagatgtttct	60
1	T L N I E D E H R L H E T S K E P D V S	
61	ctaggggtccacatggctgtctgattttcctcagggtctgggcggaaaccgggggcatggga	120
21	L G S T W L S D F P Q <u>V</u> W A E T G G M G	
121	ctggcagttcgccaagctcctctgatcatacctctgaaagcaacctctacccccgtgtcc	180
41	L A V R Q A P L I I P L K A T S T P V S	
181	ataaaacaatacccatgtcacaagaagccagacgggggatcaagccccacatacagaga	240
61	I K Q Y P M S Q E A R <u>R</u> G I K P H I Q R	
241	ctgttgaccaggggaataactggtaccctgccagtcctccctggaacacgcccctgtaccc	300
81	L L D Q G I L V P C Q S P W N T P L L P	
301	gttaagaaaccagggactaatgattataggcctgtccaggatctgagagaagtcaacaag	360
101	V K K P G T N D Y R P V Q D L R E V N K	
361	cgggtggaagacatccacccccacgtgcccaacccttacaacctcttgagcgggtccca	420
121	R V E D I H P T V P N P Y N L L S G L P	
421	ccgtcccaccagtggtacactgtgcttgatttaaaggatgcctttttctgcctgagactc	480
141	P S H Q W Y T V L D L K D A F F C L R L	
481	cacccaccagtcagcctctcttcgcctttgagtgagagatccagagatgggaatctca	540
161	H P T S Q P L F A F E W R D P E M G I S	
541	ggacaattgacctggaccagactccacaggggtttcaaaaacagtcccaccctgtttgat	600
181	G Q L T W T R L P Q G F K N S P T L F D	
601	gaggcactgcacagagacctagcagacttcgggatccagcaccagacttgatcctgcta	660
201	E A L H R D L A D F R I Q H P D L I L L	
661	cagtacgtggatgacttactgtctggccgacttctgagctagactgccaacaaggtact	720
221	Q Y V D D L L A A T S E L D C Q Q G T	
721	cgggccctgttacaaaccctaggggaacctcgggtatcgggcctcggccaagaaagccaa	780
241	R A L L Q T L G N L G Y R A S A K K A Q	
781	atttgccagaaacaggtcaagtatctgggtatcttctaaaagagggtcagagatggctg	840
261	I C Q K Q V K Y L G Y L L K E G Q R W L	
841	actgaggccagaaaacgtactgtgatggggcagcctactccgaagaccctcgacaacta	900
281	T E A R K <u>R</u> T V M G Q P T P K T P R Q L	
901	aggaaagttcctagggacggcaggtctctgtgcctctggatccctgggttgagaaatg	960
301	R <u>K</u> F L G T A G F C R L W I P G F A E M	
961	gcagcccccttgatccctctcacaaaaacggggactctgtttaattggggccagaccaa	1020
321	A A P L Y P L T K T G T L F N W G P D Q	
1021	caaaaggcctatcaagaaatcaagcaagctcttctaactgccccagccctgggggttgcca	1080
341	Q K A Y Q E I K Q A L L T A P A L G L P	
1081	gatttgactaagccctttgaactctttgtcgacgagaagcagggctacgccaaaggtgtc	1140
361	D L T K P F E L F V D E K Q G Y A K G V	
1141	ctaacgcaaaaactgggacctcggcgctcgccgggtggcctacctgtccaaaagctagac	1200
381	L T Q K L G P <u>R</u> R R P V A Y L S K K L D	
1201	ccagtagcagctgggtggcccccttgccctacggatggtagcagccattgccgtactgaca	1260
401	P V A A G W P P C L R M V A A I A V L T	

Figura 1

ES 2 880 366 T3

1261	aaggatgcaggcaagctaaccatgggacagccactagtcattcgggcccccatgcagta	1320
421	K D A G K L T M G Q P L V I <u>R</u> A P H A V	
1321	gaggcactagtcaaacaaccccccgaccgctggcctttccaacgcccgatgactcactat	1380
441	E A L V K Q P P D R W L S N A R M T H Y	
1381	caggccttgcttttggacacggaccgggtccagttcggaccggtggtagccctgaaccg	1440
461	Q A L L L D T D R V Q F G P V V A L N P	
1441	gctacgctgctccactgcctgaggaagggtgcaacacaactgccttgatatacctggcc	1500
481	A T L L P L P E E G L Q H N C L D I L A	
1501	gaagcccacggaacccgacccgacctaacggaccagccgctcccagacgccgaccacacc	1560
501	E A H G T R P D L T D Q P L P D A D H T	
1561	tggtagacggatggaagcagtcctttacaagaggacagcgtaaggcgggagctgcggtg	1620
521	W Y T D G S S L L Q E G Q R K A G A A V	
1621	accaccgagaccgaggaatctgggctaaagccctgccagccgggacatccgctcagcgg	1680
541	T T E T E V I W A K A L P A G T S A Q R	
1681	gctgaactgatagcactcaccagggccctaaagatggcagaaggaagaagctaaatgtt	1740
561	A E L I A L T Q A L K M A E G K K L N V	
1741	tatactgatagccgttatgcttttgctactgcccataatccatggagaaatatacagaagg	1800
581	Y T D S R Y A F A T A H I H G E I Y R R	
1801	cgtgggttgctcacatcagaaggcaagagatcaaaaaataaagacgagatcttggcccta	1860
601	R G L L T S E G K E I K N K D E I L A L	
1861	ctaaaagccctctttctgcccataagacttagcataatccattgtccaggacatcaaaag	1920
621	L K A L F L P K R L S I I H C P G H Q K	
1921	ggacacagcgccgaggttagaggcaaccggatggctgaccaagcgcccgaaaggcagcc	1980
641	G H S A E A R G N R M A D Q A A R K A A	
1981	atcacagagactccagacacctctaccctcctc	2013
661	I T E T P D T S T L L	

Figura 1 (continuación)

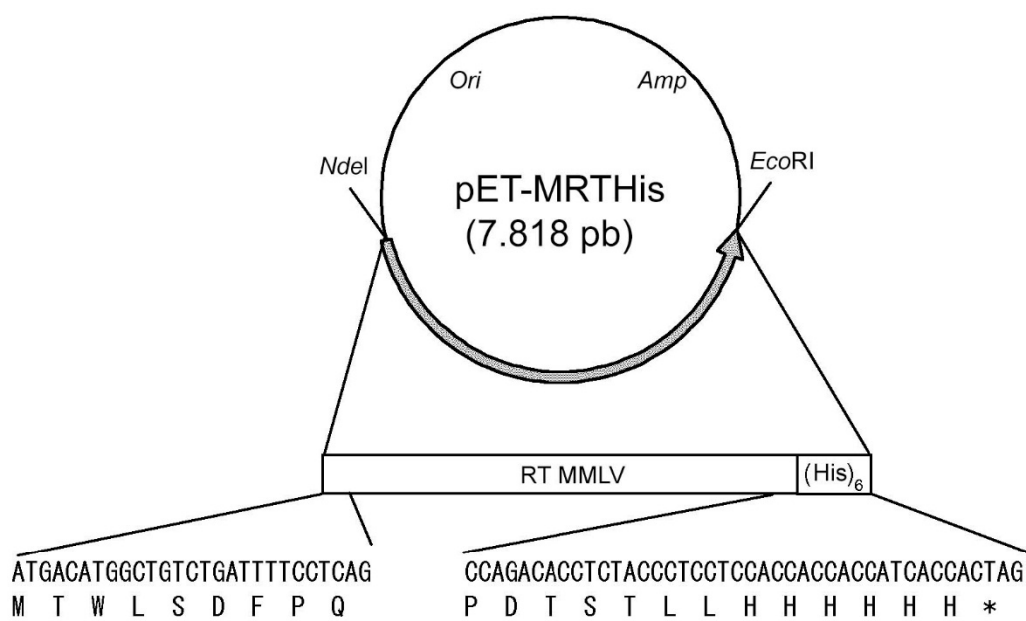


Figura 2

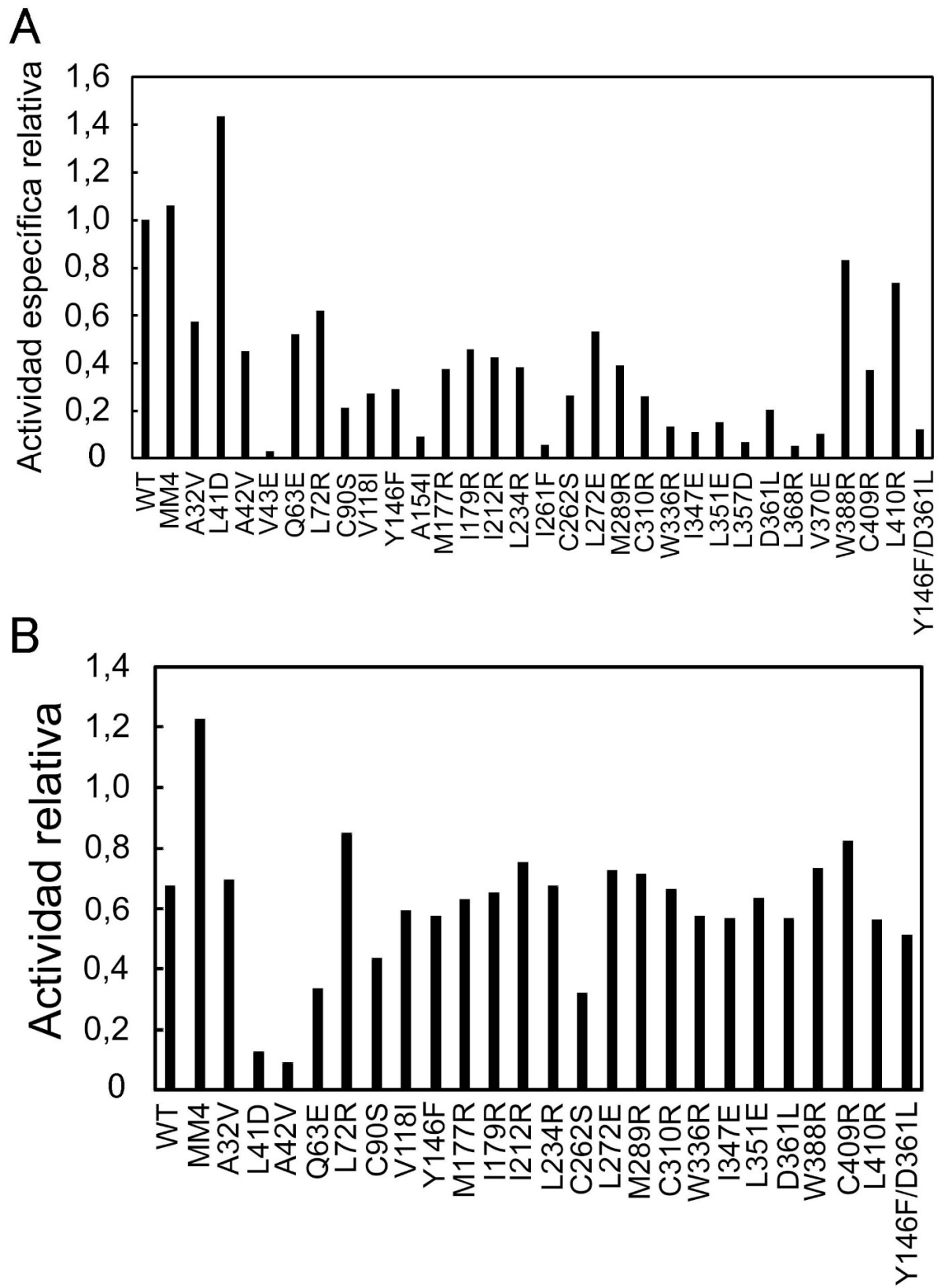
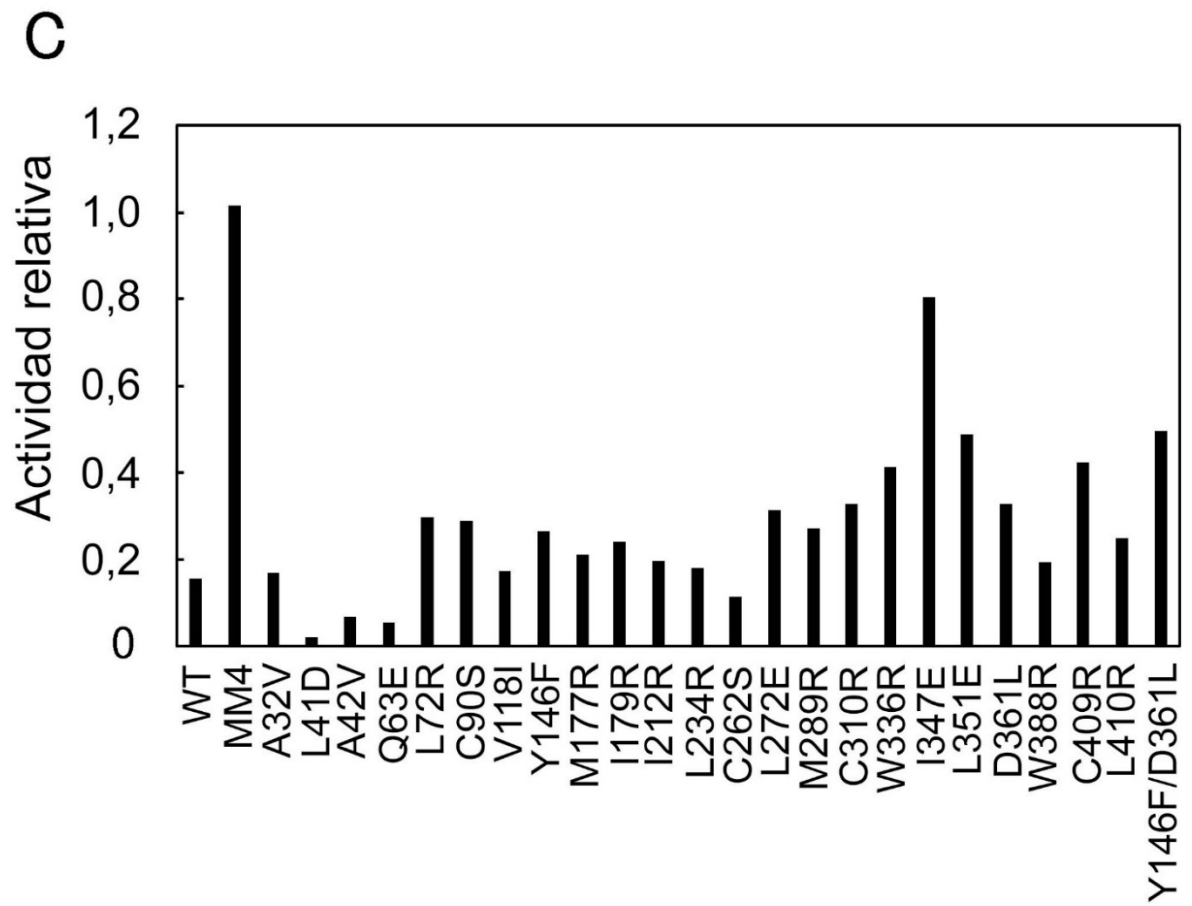
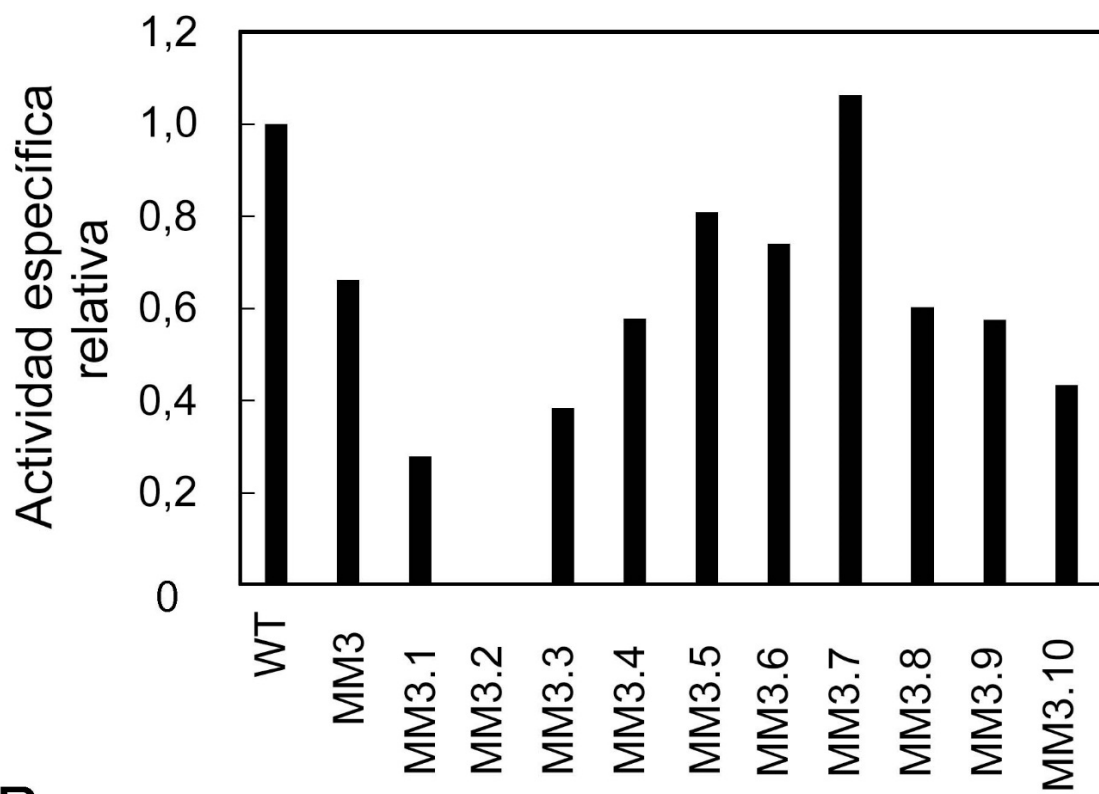


Figura 3

**Figura 3**

A



B

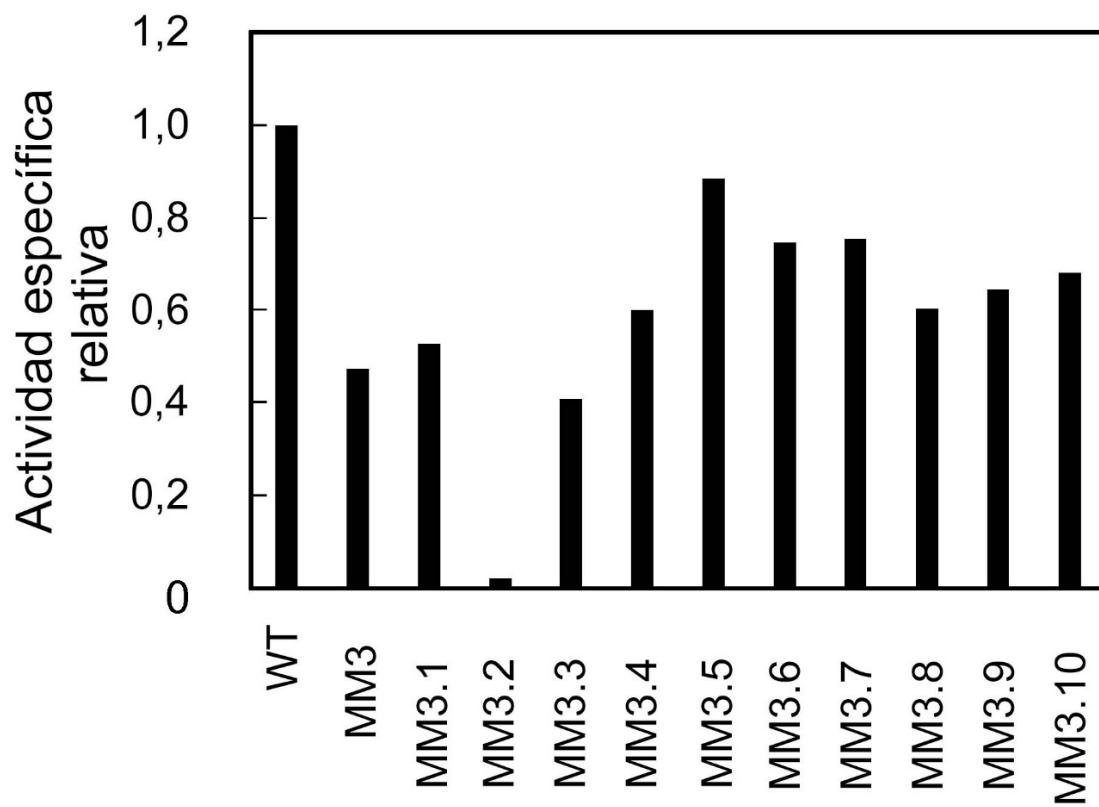
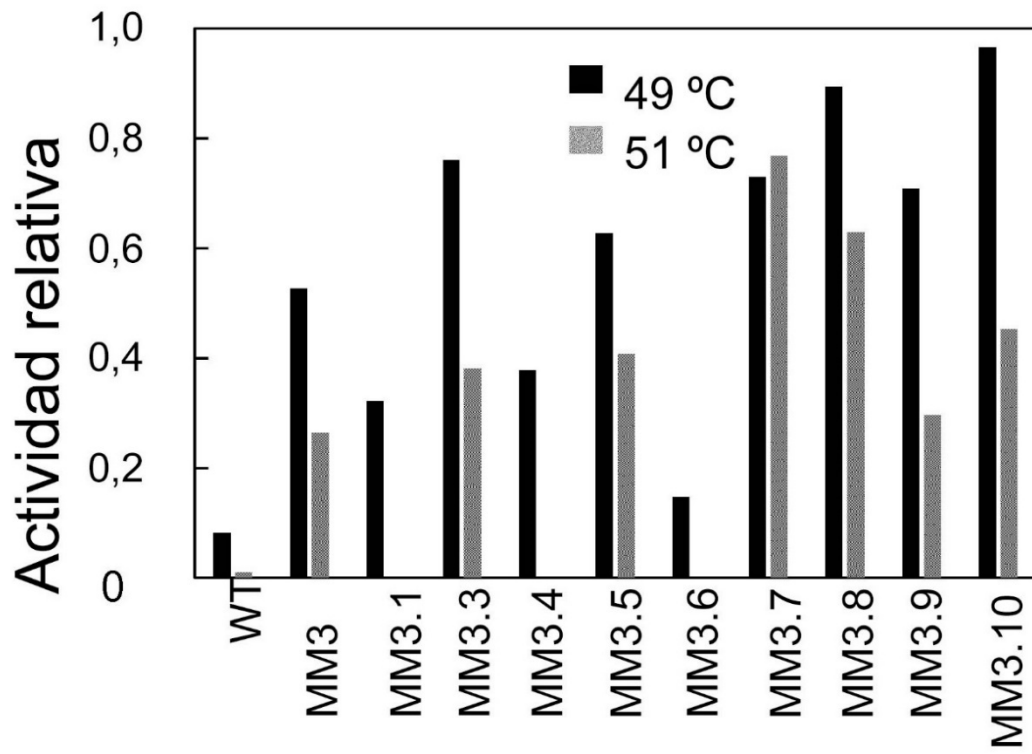


Figura 4

C



D

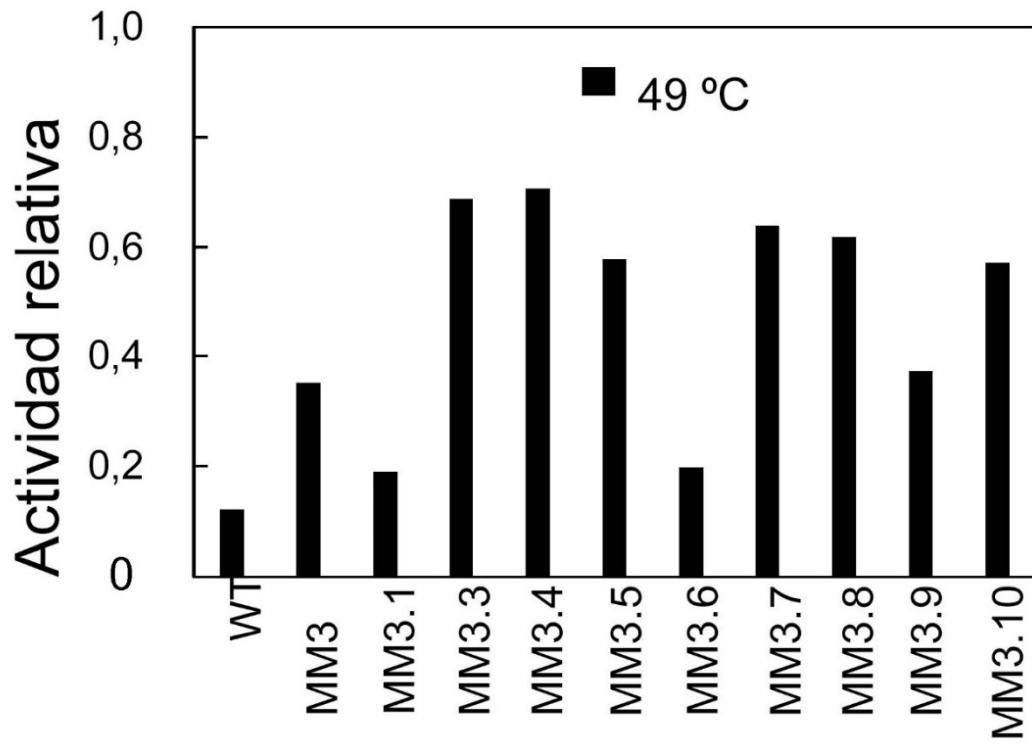
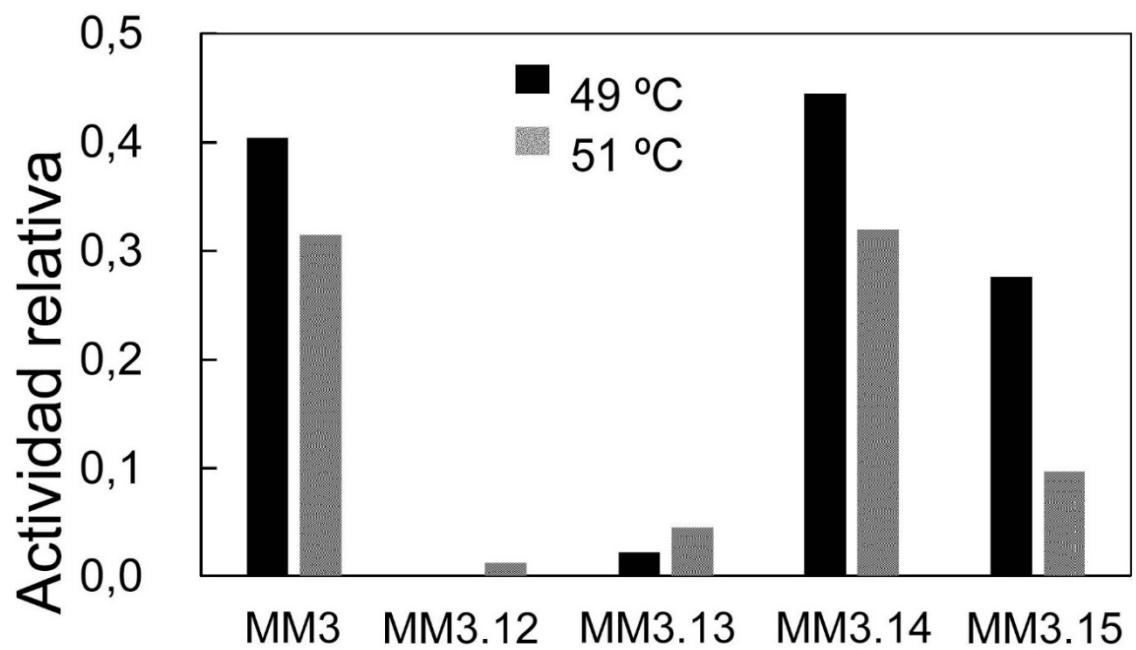


Figura 4

E



F

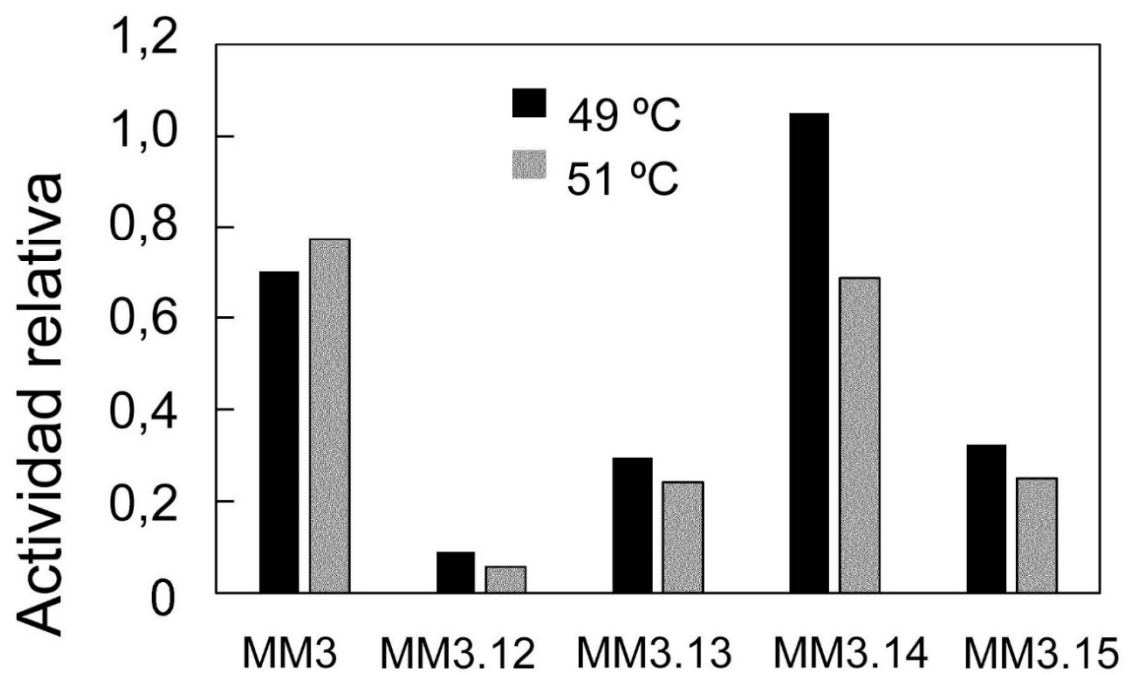


Figura 4

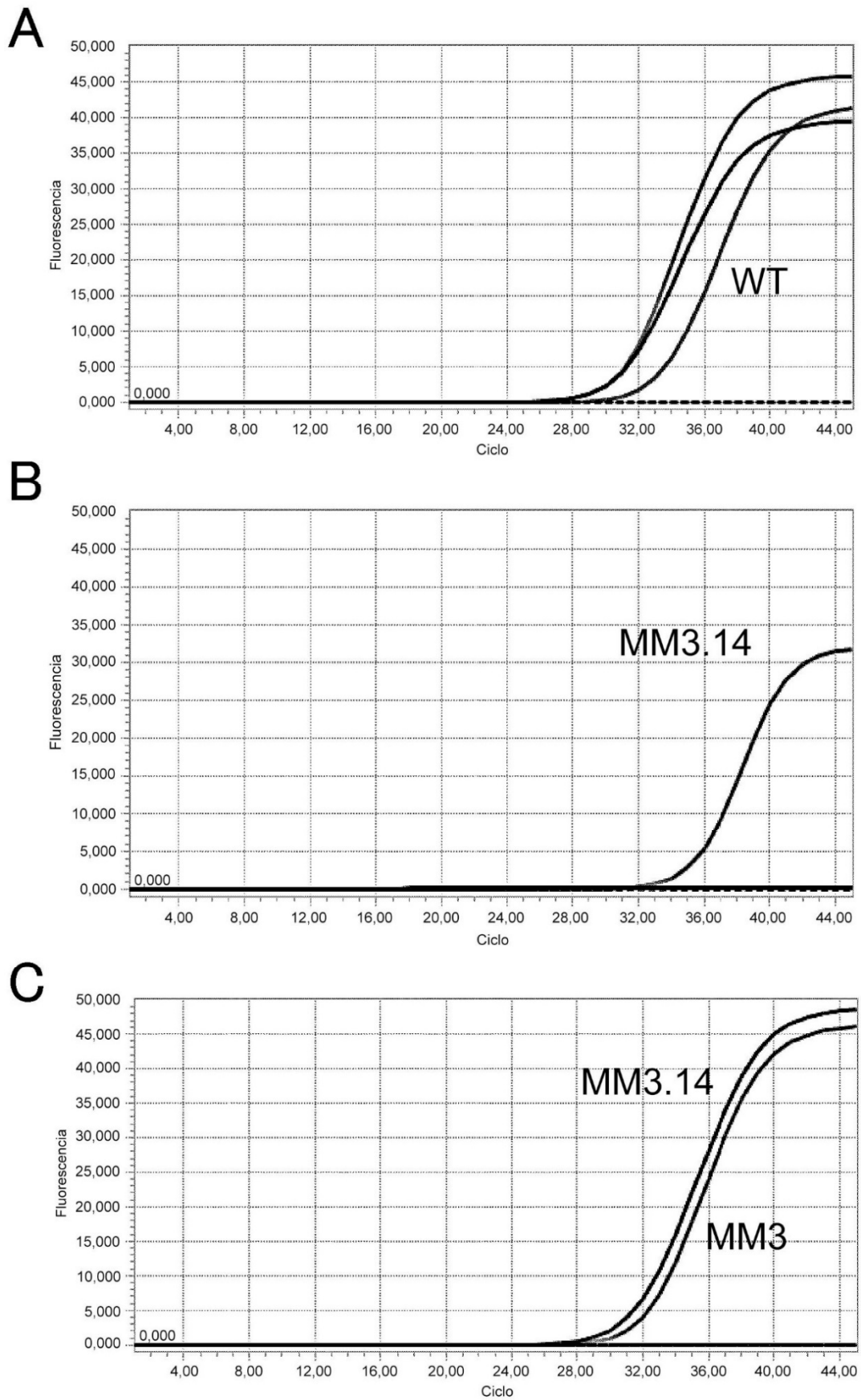
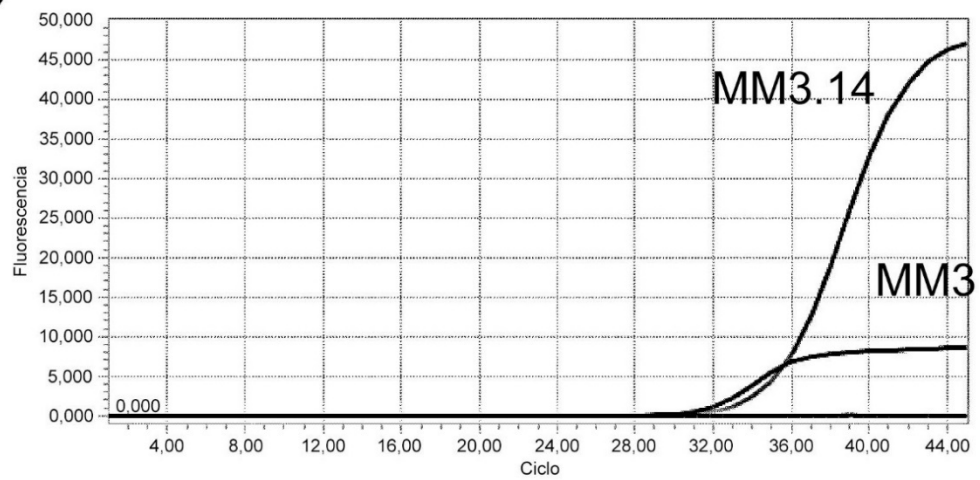


Figura 5

D



E

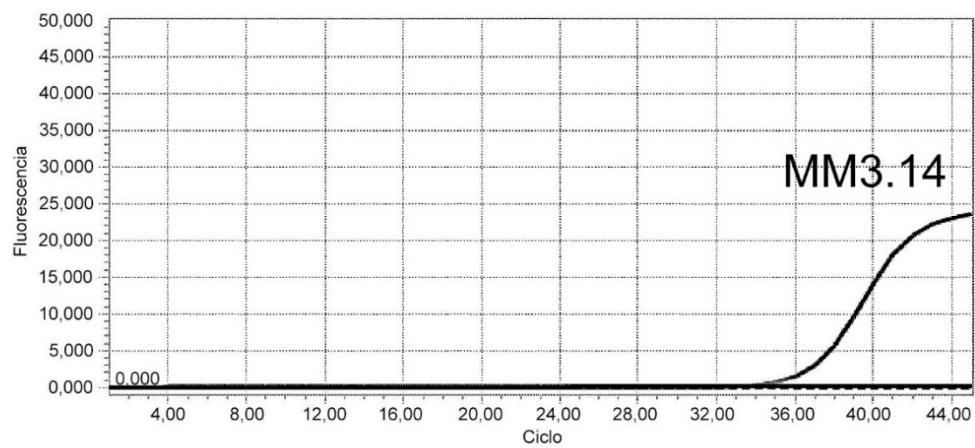


Figura 5

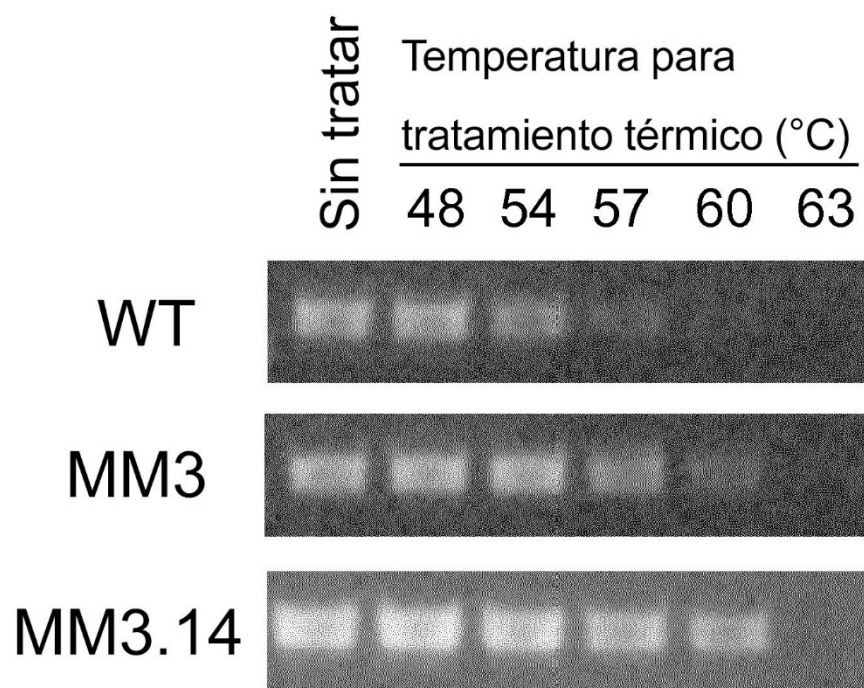


Figura 6