



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 866**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00956962 .5**
86 Fecha de presentación : **06.09.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1211318**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54 Título: **Paramixovirus que contienen una secuencia de inicio de la transcripción modificada.**

30 Prioridad: **06.09.1999 JP 11-252231**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **DNAVEC Research, Inc.**
25-11 Kannondai 1-chome
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0856, JP

72 Inventor/es: **Nagai, Yoshiyuki;**
Kato, Atsushi y
Hasegawa, Mamoru

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 288 866 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

Paramixovirus que contienen una secuencia de inicio de la transcripción modificada.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a virus recombinantes de la familia Paramyxoviridae que contienen una secuencia de inicio de la transcripción modificada.

10 **Antecedentes**

Los paramixovirus tienen como genoma un ARN de cadena negativa no segmentado. En el genoma están codificados seis genes y comúnmente hay una secuencia corta (E-IG-S señal) ligada a cada gen. Estas secuencias señal están muy conservadas especialmente dentro de un género y dentro de una familia, y notablemente muy conservadas entre los genes de una especie de virus dada (Feldmann, H.E. y col., 1992, Virus Res. 24:1-19).

El virus Sendai (SeV), clasificado dentro de los Respirovirus en la familia Paramyxoviridae, es un virus con ARN de cadena negativa no segmentado, con envoltura, que está considerado como el prototipo de la subfamilia Paramyxovirinae. El genoma del SeV tiene 15.384 bases de tamaño, comenzando con una región líder 3' corta, seguida por seis genes que codifican las proteínas N (nucleocápsida), P (fosfo), M (matriz), F (fusión), HN (hemaglutinina-neuraminidasa) y L (grande), y finalizando con una corta región trailer 5'. Además de la proteína P, el segundo gen expresa las proteínas accesorias V y C mediante un proceso conocido como edición cotranscripcional que inserta un residuo G no contenido en el molde (Park, K.H. y M. Krystal, 1992, J. Virol. 66:7033-7039; Paterson, R.G. y R.A. Lamb, 1990, J. Virol. 64:4137-4145; Thomas, S.M. y col., 1988, Cell 54:891-902; Vidal, S. y col., 1990, J. Virol. 64:239-246) y mediante inicios alternativos de la traducción, respectivamente (Gupta, K.C. y E. Ono, 1997, Biochem. J. 321:811-818; Kuronati, A. y col., 1998, Gene Cells 3:111-124). El genoma está estrechamente asociado con la proteína N, formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) helicoidal. Este RNP, pero no el ARN desnudo, es el molde para la transcripción y la replicación (Lamb, R.A. y D. Kolakofsky, 1996, Paramyxoviridae: The viruses and their replication, pp. 1177-1204, en Fields Virology, 3ª edición, Fields, B.N., D.M. Knipe y P.M. Howley y col. (ed.), Raven Press, New York, N.Y.). Hay solamente un único promotor en el extremo 3' para la ARN polimerasa vírica que contiene las proteínas P y L (Hamaguchi, M. y col., 1983, Virology 128:105-117). Mediante el reconocimiento de la secuencia corta, conservada, de finalización (E) de la transcripción y de la secuencia de inicio (S) de la transcripción en el límite de cada gen, la polimerasa produce ARN líder y cada uno de los ARNm (Glazier, K. y col., 1997, J. Virol. 21:863-871). Existe una secuencia intergénica (IG) trinucleotídica entre la secuencia E y la secuencia S, que no se transcribe (Gupta, K.C. y D.W. Kingsbury, 1984, Nucleic Acids Res. 12:3829-3841; Luk, D. y col., 1987, Virology 160:88-94). Como la eficacia para reiniciar la transcripción en el límite de cada gen es elevada pero no perfecta, los transcritos procedentes de los genes corriente abajo son menos abundantes que los procedentes de los genes corriente arriba. Por tanto, cada ARNm no es sintetizado en cantidades equimolares en las células infectadas, sino que existe una atenuación polar de la transcripción hacia el extremo 5' (Glazier, K. y col., 1997, J. Virol 21:863-871; Homann, H.E. y col., 1990, Virology 177:131-140; Lamb, R.A. y D. Kolakofsky, 1996, Paramyxoviridae: The viruses and their replication, pp. 1177-1204, en Fields Virology, 3ª edición, Fields, B.N., D.M. Knipe y P.M. Howley y col. (ed.), Raven Press, New York, N.Y.).

Después de la traducción de los ARNm y de la acumulación de los productos de la traducción, tiene lugar la replicación del genoma. Aquí, la misma ARN polimerasa vírica conduce a la replicación utilizando el mismo molde de RNP, pero ahora ignora de algún modo la secuencia E y la secuencia S respectivas de cada ARNm y genera una (+)RNP de longitud completa antígenómica, de sentido positivo (Lamb, R.A. y D. Kolakofsky, 1996, Paramyxoviridae: The viruses and their replication, pp. 1177-1204, en Fields Virology, 3ª edición, Fields, B.N., D.M. Knipe y P.M. Howley y col. (ed.), Raven Press, New York, N.Y.). La polimerasa entra en el promotor en el extremo 3' de (+)RNP para generar (-)RNP genómica, que sirve como molde para el siguiente ciclo de transcripción y replicación.

La secuencia E (3'-AUUCUUUUU-5' en sentido negativo genómico) está totalmente conservada entre los seis genes del genoma del SeV. Se cree que los cinco residuos U de la última mitad permiten el deslizamiento de la polimerasa que genera poli(A). En contraste, las secuencias S varían ligeramente y son generalizadas como 3'-UCCCW-VUUWC-5' (Gupta, K.C. y D.W. Kingsbury, 1984, Nucleic Acids Res. 12:3829-3841). Específicamente, la secuencia S es UCCCACUUUC para los genes P, M y HN, UCCCAGUUUC para el gen N, UCCCuUUUC para el gen F y UCCCACUUaC para el gen L. Se observan diferencias idénticas en todas las cepas de SeV secuenciadas hasta la fecha, independientemente de las diferencias en el procedimiento de aislamiento, historia de países y virulencia para el huésped natural tal como los ratones, sugiriendo que las variaciones son específicas de locus. Es posible que estas diferencias se produzcan como resultado de la acumulación de nucleótidos en lugares que no se ven afectados por variaciones en la secuencia S. Otra posibilidad es que estas diferencias se produzcan debido a sustituciones de nucleótidos en lugares importantes de la señal y la selección de los virus que hayan adquirido la capacidad de regular la expresión de cada gen durante la evolución vírica.

Hasta ahora, varios estudios con sistemas de moldes modelo de varios virus ARN de cadena negativa no segmentada han indicado que las secuencias S son en efecto críticas para el inicio de la transcripción, pero se toleran hasta cierto grado variaciones en la secuencia (Barr, J.N. y col., 1997, J. Virol. 71:1794-1801; Barr, J.N. y col., 1997, J. Virol. 71:8718-8725; Hwang, L.N. y col., 1998, J. Virol. 72:1805-13; Kuo, L. y col., 1996, J. Virol. 70:6143-6150;

Rassa, J.C. y G.D. Parks, 1998, *Virology* 247:274-286; Stillman, E.A. y M.A. Whitt, 1998, *J. Virol.* 72:5565-5572). Se demostró que ciertas sustituciones de nucleótidos en estas secuencias S disminuían la eficacia de inicio de la transcripción, sugiriendo que la expresión génica está también modulada por variaciones naturales que tienen lugar en el ciclo vital del virus (Kuo, L. y col., 1996, *J. Virol.* 70:6892-6901; Kuo, L. y col., 1997, *J. Virol.* 71:4944-4953; Stillman, E.A. y M.A. Whitt, 1997, *J. Virol.* 71:2127-2137). Sin embargo, en los sistemas de moldes modelo, todos los acontecimientos requeridos en las etapas tempranas del ciclo vital natural, como la transcripción primaria, son eludidos por el suministro sucesivo y constante de proteínas que actúan en trans (Nagai, Y. Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev. Medical. Virol.* 9(2):83-99 (1999)). La transcripción y la replicación de minigenomas están desacopladas en estos sistemas. Los virus vaccinia que expresan polimerasa de T7 utilizados a menudo para producir proteínas que actúan en trans enmascaran los efectos sutiles de las mutaciones mediante, por ejemplo, modificaciones post-transcripcionales por enzimas de "capping" codificados por los virus vaccinia. Además, las eficacias de transfección pueden no ser iguales a lo largo de todo el experimento (Bukreyev, A. y col., 1996, *J. Virol.* 70:6634-6641; He, B. y col., 1997, *Virology* 237:249-260). Esto es, los efectos de las sustituciones de nucleótidos en la secuencia S sobre el inicio de la transcripción no pueden ser examinados con precisión en los sistemas de moldes modelo. Por tanto, para evaluar de forma comprensible las funciones de la secuencia S y de la secuencia E, fue necesario introducir mutaciones en el genoma vírico de longitud completa.

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar vectores víricos de Paramyxoviridae en los cuales se ha modificado la secuencia S con el fin de modificar la expresión de genes situados corriente abajo de la misma o un método para producir dichos vectores.

Los presentes inventores han conseguido ya con éxito la construcción de un sistema para producir SeV infecciosos mediante la manipulación de sus genomas utilizando técnicas de ADN recombinante. La utilización de este sistema permite la regeneración de virus ARN de cadena negativa basada en su ADN correspondiente, y la realización de genética inversa del SeV mediante la manipulación de varios genes del virus infeccioso (Kato, A. y col., 1997; *EMBO J.* 16:578-587; Kato, A. y col., 1997, *J. Virol.* 71:7266-7272; Kuo, L. y col., 1996, *J. Virol.* 70:6892-6901; Nagai, Y., 1999, *Rev. Medical. Virol.* 9:83-99; Sakaguchi, T. y col., 1997, *Virology* 235:360-366). Utilizando este sistema, los presentes inventores han intentado elucidar la significación de la heterogeneidad encontrada en las secuencias S del SeV.

Una secuencia E y una secuencia S recién sintetizadas fueron ligadas a la parte corriente arriba del gen de la luciferasa de la luciérnaga, y todo esto fue insertado en la parte corriente abajo de la región no codificadora del gen N. Las secuencias S fueron diseñadas para que tuvieran la misma secuencia que las cuatro variaciones que existen de manera natural anteriormente descritas. En el virus recombinante construido, la transcripción del ARNm de N comienza por su propia secuencia S y es detenida por la secuencia E sintética que está dentro del gen informador insertado (luciferasa). La expresión del gen informador, que está dirigida por cada una de las diferentes secuencias S, fue cuantificada y comparada.

Los resultados aquí obtenidos mostraban claramente que la secuencia S natural para el gen F tenía una actividad de reinicio significativamente menor que las otras tres secuencias S. Cuando la síntesis de proteínas *de novo* es bloqueada y se inhibe la replicación del genoma, solamente tiene lugar la transcripción y no la replicación. Mediante la realización de experimentos bajo tales condiciones, se confirmó que la expresión reducida del gen de la luciferasa por la señal específica de F estaba en efecto causada principalmente a nivel transcripcional, y no era un resultado secundario de la replicación (Fig. 4). Este experimento mostró además que la actividad de reinicio dirigida por la secuencia S del gen F era un cuarto aproximadamente de la de las otras tres.

La capacidad de reinicio de diferentes secuencias S fue determinada posteriormente sustituyendo la secuencia S natural del gen F por la de los genes P/M/HN que tenía una eficacia de reinicio superior y examinando la capacidad de replicación del virus recuperado (SeV/mSf) en células cultivadas, *in ovo*, y en ratones. Como resultado, los inventores encontraron que la secuencia S sustituida incrementaba no sólo la expresión del gen F, sino también la expresión de genes corriente abajo, de nuevo a nivel transcripcional (Figs. 7 y 9).

Esto es, los presentes inventores encontraron que la actividad de reinicio de la secuencia S de cada uno de los genes de virus pertenecientes a la familia Paramyxoviridae variaba con la secuencia S. Se reveló también que la sustitución de la secuencia S de un gen particular por otra secuencia S con una actividad de reinicio diferente, permitía la modificación de la expresión no sólo del gen justo después de la secuencia, sino también de genes situados más corriente abajo del gen a nivel transcripcional, para completar la invención.

Esta invención se refiere a vectores víricos de Paramyxoviridae en los que se ha modificado una secuencia S, a un método para incrementar o disminuir el nivel de expresión de un gen, a los virus y al ADN correspondientes, y más específicamente se refiere a:

(1) un virus Paramyxoviridae, en el cual la secuencia de inicio de la transcripción 3'-UCCCUAUUU-5' de al menos un gen ha sido sustituida por una secuencia seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCCACUUU-5', 3'-UCCCAGUUU-5' y 3'-UCCCACUUA-5',

ES 2 288 866 T3

- (2) un virus Paramyxoviridae, en el cual una secuencia de inicio de la transcripción seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' y 3'-UCCCACUUA-5' de al menos un gen ha sido sustituida por 3'-UCCCUAUUU-5',
- 5 (3) el virus de acuerdo con la reivindicación (1) o (2), donde dicho virus es deficiente en al menos un gen F, M o HN,
- (4) el virus de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (3), donde dicho virus tiene un gen foráneo,
- 10 (5) un ADN que codifica el genoma del virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- (6) un método para incrementar el nivel de expresión de un gen incluido en un virus Paramyxoviridae que tiene la secuencia de inicio de la transcripción 3'-UCCCUAUUU-5', donde el método comprende la sustitución de dicha secuencia por una secuencia seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' y 3'-UCCCACUUA-5',
- 15 (7) un método para disminuir el nivel de expresión de un gen incluido en un virus Paramyxoviridae que tiene la secuencia de inicio de la transcripción seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' y 3'-UCCCACUUA-5', donde el método comprende la sustitución de dicha secuencia por 3'-UCCCUAUUU-5',
- 20 (8) un virus Paramyxoviridae que tiene un gen foráneo, donde dicho gen foráneo tiene la secuencia de inicio de la transcripción 3'-UCCCUAUUU-5',
- 25 (9) el virus de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho virus es deficiente en al menos un gen F, M o HN, y
- (10) un ADN que codifica el genoma del virus de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9.

30 En la presente, se define un “vector vírico de Paramyxoviridae” como un vector (o vehículo) que deriva de un virus de la familia Paramyxoviridae y que puede transferir un gen a una célula huésped. El vector vírico de Paramyxoviridae de la presente invención puede ser una ribonucleoproteína (RNP) o una partícula vírica que posea infectividad. En la presente, se define “infectividad” como la capacidad del vector vírico para transferir a células, a través de sus capacidades de adhesión celular y de fusión de membranas, el genoma del virus contenido en las partículas víricas y expresarlo.

35 El vector vírico de Paramyxoviridae puede tener capacidad de replicación o puede ser un vector deficiente sin capacidad de replicación. En la presente, se define “tener capacidad de replicación” como la capacidad de los vectores víricos para replicarse y producir partículas víricas infecciosas en células huésped infectadas con los vectores víricos.

40 El vector vírico de la familia Paramyxoviridae de esta invención puede llevar un gen foráneo de manera expresable. Tales vectores víricos pueden ser preparados como vectores víricos recombinantes de Paramyxoviridae. En la presente, se define un “vector vírico recombinante” de Paramyxoviridae como uno construido mediante ingeniería genética, o sus productos amplificados. Por ejemplo, pueden generarse vectores víricos recombinantes de Paramyxoviridae a partir de ADNc vírico recombinante de Paramyxoviridae.

45 En la presente, se define un virus de Paramyxoviridae como un virus perteneciente a la familia Paramyxoviridae o un derivado del mismo. La presente invención puede ser aplicada a, por ejemplo, un virus de Paramyxoviridae tal como el virus Sendai, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus respiratorio sincitial, el virus de la peste bovina, el virus del moquillo canino, el virus de la parainfluenza de simio (SV5) y el virus de la parainfluenza humana de tipo I, II y III. El vector vírico y el ADN del vector de la presente invención derivan preferiblemente de un virus del género *Paramyxovirus* o de un derivado del mismo. Los virus del género *Paramyxovirus* a los cuales es aplicable la presente invención incluyen los virus de la parainfluenza de tipo I incluyendo el virus Sendai y el HA2 humano, los virus de la parainfluenza de tipo II incluyendo SV5 y SV41 de simio y CA humano, los virus de la parainfluenza de tipo III incluyendo SF bovino y HA1 humano, los virus de la parainfluenza de tipo IV incluyendo el subtipo A y el subtipo B, el virus de las paperas, el virus de la enfermedad de Newcastle y muchos otros virus del género *Paramyxovirus*. Muy preferiblemente, el vector vírico y el ADN del vector de la invención derivan del virus Sendai. Estos virus pueden ser cepas de tipo salvaje, cepas mutantes, cepas pasadas en el laboratorio, cepas construidas artificialmente, etcétera. Pueden utilizarse también virus incompletos tales como la partícula DI (Willenbrink, W. y Neubert, W.J., 1994, J. Virol. 68:8413-8617), oligonucleótidos sintetizados, etcétera, como material para generar el vector vírico de la presente invención.

60 En la presente, “ADN del vector vírico” significa ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el genoma de un vector vírico. En este caso “ADN” incluye ADN monocatenario y ADN bicatenario.

65 En la presente, los “genes N, P, M, F, HN y L” de los virus de la familia Paramyxoviridae representan aquellos genes que codifican la proteína de la nucleocápsida, la fosfoproteína, la proteína de la matriz, la proteína de fusión,

ES 2 288 866 T3

hemaglutinina-neuraminidasa y la proteína grande, respectivamente. Los genes de cada virus de la subfamilia Paramyxovirinae se describen de manera general según sigue. En general, el gen N puede ser indicado también como “gen NP”.

5	<i>Respirovirus</i>	N	P/C/V	M	F	HN	-	L
	<i>Rublavirus</i>	N	P/V	M	F	HN	(SH)	L
	<i>Morbillivirus</i>	N	P/C/V	M	F	H	-	L

10 Por ejemplo, los números de acceso en la base de datos de secuencias de nucleótidos de cada gen del virus Sendai son M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046 y X17218 para el gen N; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007 y X17008 para el gen P; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056 para el gen M; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 y X02131 para el gen F; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131 para el gen HN; y D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587 y X58886 para el gen L.

15 Esta invención proporciona ADNs de vectores víricos en los cuales la secuencia S de al menos un gen del genoma de un virus perteneciente a la familia Paramyxoviridae ha sido modificado con el fin de modificar los niveles de expresión del gen y de genes situados corriente abajo del mismo en el huésped. Los ADNs de los vectores víricos de esta invención son capaces de modificar los niveles de transcripción no sólo de un gen justo después de la secuencia S sino también de un(os) gen(es) corriente abajo del mismo, mediante la modificación de la secuencia S.

20 La “modificación de una secuencia de inicio de la transcripción (S)” se refiere en esta invención a la realización de una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia S de un gen del genoma de un virus perteneciente a la familia Paramyxoviridae o la sustitución de la secuencia S de un gen por la de otro gen de un virus perteneciente a los Paramyxoviridae.

25 La modificación de la secuencia S para obtener una secuencia con una actividad de reinicio deseada, puede ser llevada a cabo diseñando una variedad de secuencias S y detectando la actividad de reinicio utilizando el ensayo de la luciferasa tal como se describe en el Ejemplo 1 con el fin de seleccionar una secuencia que tenga la actividad deseada. Las secuencias S pueden ser modificadas utilizando técnicas conocidas de ingeniería genética. Por ejemplo, según se describe en el Ejemplo 3, puede introducirse cualquier mutación deseada en la secuencia S del gen F del genoma de un virus perteneciente a los Paramyxoviridae utilizando mutagénesis específica de sitio.

30 Los vectores víricos de Paramyxoviridae de acuerdo con esta invención incluyen aquéllos en los cuales se ha modificado una secuencia S de tal manera que el nivel de expresión de, por ejemplo, el gen F esté significativamente elevado en comparación con el virus de tipo salvaje. Una elevación significativa se refiere a una elevación de los niveles de expresión, por ejemplo, de un 20% o más, preferiblemente un 40% o más, más preferiblemente el doble o más, incluso más preferiblemente 3 veces o más en comparación con la expresión del gen F de tipo salvaje. Tales vectores pueden ser producidos, por ejemplo, sustituyendo la secuencia S del gen F por la del gen P, M, HN, N o L. Los vectores víricos de Paramyxoviridae de acuerdo con esta invención incluyen aquéllos en los cuales el nivel de expresión de cualquiera de los genes P, M, HN, N o L, o de cualquier combinación de los mismos, está significativamente reducido en comparación con la expresión del tipo salvaje. Una reducción significativa significa una reducción de la expresión de, por ejemplo, el 20% o mayor, preferiblemente el 30% o mayor, más preferiblemente el 40% o mayor e incluso más preferiblemente del 60% o mayor, en comparación con la del tipo salvaje. Tales vectores pueden ser producidos, por ejemplo, sustituyendo la secuencia S del gen P, M, HN, N y/o L por la del gen F. Los niveles de expresión de los genes pueden ser medidos, por ejemplo, mediante la detección del ARNm (producto de la transcripción) o de las proteínas (producto de la traducción). El nivel de expresión génica es medido preferiblemente bajo condiciones que minimicen el efecto de la tasa de replicación del virus. Por ejemplo, según se muestra en la Fig. 3 del Ejemplo 1, el nivel de expresión génica puede ser medido bajo condiciones en las que tenga lugar solamente un ciclo de replicación, alternativamente, según está representado en la Fig. 4, mediante la estimación específica de la transcripción primaria a través de la detección de ARNs o proteínas. Estas medidas pueden ser llevadas a cabo, por ejemplo, mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1 ó 2.

35 Los presentes inventores examinaron la actividad de reinicio de 4 secuencias S diferentes encontradas en un virus de la familia Paramyxoviridae (virus Sendai), y descubrieron que la actividad era diferente en cada una de ellas y que mientras que las actividades de reinicio de las secuencias S del gen L (AGGGTGAAT), del gen P/M/HN (AGGGT-GAAA) y del gen N (AGGGTCAAA) presentaban un valor elevado, la actividad de reinicio de la secuencia S del gen F (AGGGATAAA) era baja. Por tanto, cuando se desee una actividad de reinicio elevada, pueden utilizarse las secuencias S del gen L, del gen P/M/HN o del gen N, mientras que cuando se prefiera una baja actividad de reinicio, puede utilizarse la secuencia S del gen F. Por ejemplo, la sustitución de la secuencia S del gen F por la del gen P/M/HN que tiene una elevada actividad de reinicio, puede dar lugar a la elevación de los niveles de transcripción del gen F y de los genes situados corriente abajo del mismo.

40 Hay una variedad de ventajas derivadas de la modificación de los niveles de transcripción de genes víricos de Paramyxoviridae. Por ejemplo, con un virus en el que se ha sustituido la secuencia S del gen F por una con una mayor actividad de reinicio, puede elevarse la capacidad de proliferación vírica. Además, intercambiando la secuencia S del gen F y la del gen L, podría esperarse que se elevaran únicamente los niveles de expresión de los genes F y

HN, sin afectar a la capacidad de proliferación vírica. Además, en el caso de una proteína cuya expresión elevada sea indeseable, puede limitarse el nivel de expresión de la proteína uniendo el gen de la misma a la parte corriente abajo de la secuencia S con una baja actividad de reinicio, tal como la del gen F.

5 En un genoma vírico que contiene una secuencia S modificada para que tenga una actividad de reinicio de la transcripción más elevada, el nivel de expresión del ARNm codificado por el gen corriente abajo de la secuencia S modificada está incrementado en comparación con el genoma de tipo salvaje original. Por consiguiente, cuando un gen foráneo deseado está situado corriente abajo de la secuencia S modificada, se espera que el nivel del producto génico esté también elevado. Por tanto, los vectores víricos con tales genomas son ventajosos en cuanto a que se ha mejorado la eficacia de producción del(los) producto(s) génico(s). Además, un virus con tal genoma tiene la ventaja de producir una gran cantidad de virus en un tiempo corto, cuando se recogen partículas víricas recombinantes o partículas similares a virus como composiciones farmacéuticas o vacunas. Por ejemplo, se sabe que partículas víricas incubadas a 37°C durante 2 días forman complejos entre ellas y experimentan un fenómeno de envejecimiento en el cual cambia su morfología original (Kim, J. y col., 1979, *Virology* 95:523-535). La observación de éstas bajo un microscopio electrónico ha revelado que la estructura de la nucleocápsida está firmemente plegada en las partículas víricas sintetizadas *de novo*, pero se despliega y resulta más suelta con el envejecimiento. Cuando se utilizan partículas víricas o partículas similares a virus como composiciones farmacéuticas y vacunas, es importante obtener materiales homogéneos. Por tanto, es necesario recuperar virus de un cultivo tan pronto como sea posible. Según se muestra en los Ejemplos, la presente invención puede permitir la preparación de virus modificados con un título tan elevado como de 100 veces en comparación con el virus de tipo salvaje (Fig. 5).

El vector vírico de Paramyxoviridae de la presente invención incluye, por ejemplo, vectores que tienen la capacidad de replicación y aquéllos que son capaces de proliferación autónoma. En general, el genoma del paramixovirus de tipo salvaje contiene una región líder 3' corta seguida por seis genes que codifican las proteínas N, P, M, F, HN y L, y tiene una región tráiler 5' corta en el otro extremo. El vector de la presente invención que es capaz de replicarse de manera autónoma puede ser obtenido diseñando un genoma que tenga una estructura similar a la anteriormente descrita. El vector vírico de Paramyxoviridae de la invención puede tener una alineación alterada de genes víricos, en comparación con el virus de tipo salvaje.

El vector vírico de Paramyxoviridae de la presente invención puede ser deficiente en cualquiera de los genes que están contenidos en el virus de tipo salvaje. Por ejemplo, en el caso de la reconstitución del vector del virus Sendai, se cree que las proteínas codificadas por los genes N, P/C y L son requeridas en *trans*, pero los genes puede que no sean un componente del vector vírico. En una realización, un vector de expresión que lleva los genes que codifican las proteínas puede ser cotransfectado en las células huésped con otro vector de expresión que codifique el genoma del vector para reconstituir un vector vírico. Alternativamente, un vector de expresión que codifique el genoma del virus es transfectado en células huésped portadoras de los genes que codifican las proteínas, y de este modo puede reconstituirse un vector vírico utilizando las proteínas proporcionadas por la célula huésped. La secuencia de aminoácidos de estas proteínas puede no ser idéntica a la de las derivadas del virus original, siempre que tenga una actividad equivalente o mayor en la transferencia de ácido nucleico, y puede estar mutada o sustituida por la de un gen homólogo de otro virus.

Se cree que las proteínas codificadas por los genes M, F y HN son esenciales para la propagación célula a célula de casi todos los virus de la familia Paramyxoviridae. Sin embargo, no se requieren estas proteínas cuando el vector vírico de Paramyxoviridae es preparado como RNP. Si los genes M, F y HN son componentes del genoma contenido en RNP, se producen los productos de estos genes cuando son introducidos en células huésped y se generan partículas de virus con infectividad.

La RNP puede ser introducida en las células como un complejo formado con lipofectamina, liposomas policationicos, etcétera. Específicamente, puede utilizarse una variedad de reactivos para la transfección, por ejemplo, DOTMA (Boehringer), SuperFect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169). Puede añadirse cloroquina para prevenir la degradación en el endosoma (Calos, M.P., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3015). En el caso de virus replicativos, los virus producidos pueden ser amplificados o pasados mediante reinfección en células cultivadas, en huevos de gallina embrionados o en animales (por ejemplo mamíferos tales como ratones).

En contraste, el vector vírico de Paramyxoviridae de la presente invención puede ser uno que carezca de los genes M, F y/o HN. Estos vectores pueden ser reconstituidos proporcionando los productos de un gen deficiente de manera exógena. Tales vectores pueden aún adherirse a las células huésped e inducir la fusión celular de la misma manera que el tipo salvaje. Sin embargo, las partículas víricas hijas no tienen la misma infectividad que las originales porque el genoma del vector introducido en las células carece de uno de los genes anteriores. Por tanto, estos vectores pueden ser vectores víricos más seguros que son capaces de transferir únicamente un solo gen. Por ejemplo, los genes eliminados del genoma pueden ser los genes F y/o HN. Los vectores víricos deficientes en el gen F pueden ser reconstituidos mediante la cotransfección de un plásmido de expresión que codifique el genoma de un vector vírico recombinante de Paramyxoviridae carente del gen F (conteniendo ADN del vector vírico), un vector de expresión para la proteína F y uno para las proteínas N, P/C y L en células huésped (PCT/JP00/03194 y PCT/JP00/03195). Alternativamente, pueden utilizarse células huésped en las que el gen F esté integrado en el cromosoma. La secuencia de aminoácidos de estas proteínas proporcionadas de manera exógena puede no ser idéntica a la del tipo salvaje y puede estar mutada o ser sustituida por una proteína homóloga de otro virus siempre que proporcione una actividad de transferencia génica equivalente o mayor.

Las proteínas de la envoltura del vector vírico de Paramyxoviridae de la presente invención pueden comprender una proteína distinta de la proteína de la envoltura del genoma del vector original. No hay ninguna limitación sobre tales proteínas. Éstas pueden incluir proteínas de la envoltura de otros virus tales como la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Por tanto, el vector vírico de la invención incluye un vector vírico de tipo pseudo que
5 tenga una proteína de la envoltura derivada de un virus diferente del virus original.

Cualquier gen foráneo deseado, que puede codificar o no proteínas, puede ser insertado en los ADNs del vector vírico de esta invención. Por ejemplo, el gen foráneo puede codificar ARN funcional tal como ARN de ribozimas o antisentido. Los genes foráneos pueden contener secuencias existentes en la naturaleza o secuencias diseñadas artificialmente. Por ejemplo, en la terapia génica y similares, un gen para tratar una enfermedad diana es insertado en el ADN del vector vírico. Cuando los ADNs de los vectores víricos de esta invención son utilizados para producir vectores para terapia génica, es deseable eliminar los genes F, HN y/o M de los ADNs de los vectores víricos con el fin de suprimir su toxicidad en el huésped. En el caso de la introducción de un gen foráneo en el ADN de un vector vírico, por ejemplo en el del vector vírico Sendai, es deseable insertar una secuencia que contenga un múltiplo de seis
10 nucleótidos del gen foráneo entre la secuencia E y la secuencia S del ADN del vector vírico (J. Virol., Vol. 67, N°8, 1993, p. 4822-4830), etc. Un gen foráneo puede ser insertado antes y/o después de los genes víricos respectivos (los genes N, P, M, F, HN o L). La secuencia E-I-S (secuencia de finalización de la transcripción-secuencia intermedia-secuencia de inicio de la transcripción) o una porción de la misma es insertada apropiadamente antes o después de un gen foráneo con el fin de no interferir con la expresión de los genes anteriores o posteriores al gen foráneo. El nivel de expresión de un gen foráneo insertado puede ser regulado por el tipo de secuencia S añadida al lado 5' (cabeza) del gen foráneo, así como por el lugar de la inserción del gen y las secuencias de nucleótidos anteriores y posteriores al gen. Por ejemplo, se sabe que en SeV cuanto más próximo esté el sitio de inserción al gen N, mayor será el nivel de expresión del gen insertado.

De manera general, cuanto más próxima esté la posición de inserción al extremo 3' del ARN de cadena negativa del genoma del virus (cuanto más próxima al gen N en la disposición de genes en el genoma del virus del tipo salvaje), mayor será el nivel de expresión del gen insertado. Para conseguir una expresión elevada de un gen foráneo, el mismo es insertado preferiblemente en la región próxima al extremo 3' del genoma de cadena negativa tal como en la parte corriente arriba del gen N (secuencia 3' flanqueante en la cadena negativa), o entre los genes N y P. Por el contrario,
30 cuanto más próxima esté la posición de inserción al extremo 5' del ARN de cadena negativa (cuanto más próxima al gen L en la disposición de genes en el genoma del virus de tipo salvaje), menor será el nivel de expresión del gen insertado. Para reducir la expresión de un gen foráneo, el mismo puede ser insertado en la posición más 5' sobre la cadena negativa, esto es, corriente abajo del gen L en el genoma del virus de tipo salvaje (región flanqueante 5' del gen L sobre la cadena negativa) o corriente arriba del gen L (región flanqueante 3' del gen L en la cadena negativa). De este modo, la posición de inserción de un gen foráneo puede ser ajustada apropiadamente con el fin de obtener el nivel de expresión deseado del gen o de optimizar la combinación del inserto con los genes víricos que le rodean. Con el fin de facilitar la inserción de un gen foráneo, puede diseñarse un sitio de clonaje en la posición de inserción. Por ejemplo, el sitio de clonaje puede ser la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción. Los sitios de restricción en el ADN del vector vírico pueden ser utilizados para insertar un gen foráneo. El sitio de clonaje puede ser un sitio de clonaje múltiple que contenga secuencias de reconocimiento para múltiples enzimas de restricción. El ADN del vector de la presente invención puede tener otros genes foráneos en posiciones distintas de las utilizadas para la inserción anterior.

Pueden construirse vectores de SeV recombinantes que contengan un gen foráneo según sigue de acuerdo con, por ejemplo, la descripción de "Kato, A. y col., 1997, EMBO J. 16:578-587" y "Yu, D. y col., 1997, Genes Cells 2:457-466".

En primer lugar, se prepara una muestra de ADN que contenga la secuencia de nucleótidos del ADNc de un gen foráneo deseado. Es preferible que la muestra de ADN pueda ser identificada electroforéticamente como un único plásmido a concentraciones de 25 ng/ μ l o mayores. A continuación se describirá como ejemplo un caso en el que un gen foráneo es insertado en el genoma vírico que codifica ADN utilizando el sitio de NotI. Cuando un sitio de reconocimiento de NotI está incluido en la secuencia de nucleótidos del ADNc diana, es preferible eliminar previamente el sitio de NotI mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos utilizando mutagénesis específica de sitio o un método similar, con el fin de no alterar la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc. A partir de esta muestra de ADN, el fragmento génico deseado es amplificado y recuperado mediante PCR. Con el fin de tener sitios de NotI en ambos extremos del fragmento de ADN amplificado y añadir posteriormente una copia de la secuencia E-I-S de SeV a un extremo, se preparan una secuencia de ADN sintética del lado directo y una secuencia de ADN sintética del lado inverso (cadena antisentido) como par de cebadores conteniendo una secuencia del sitio de corte del enzima de restricción NotI, la secuencia E-I-S y una secuencia parcial del gen diana.

Por ejemplo, para asegurar el corte por NotI, la secuencia de ADN sintética del lado directo es colocada en una forma en la cual se seleccionan dos o más nucleótidos (preferiblemente 4 nucleótidos excluyendo GCG y GCC, secuencias que se originan en el sitio de reconocimiento de NotI, más preferiblemente ACTT) en el lado 5' del ADN sintético, el sitio de reconocimiento de NotI "cgcgccgc" es añadido a su lado 3', y al lado 3' del mismo se añaden cualquiera de 9 nucleótidos deseados o 9 nucleótidos más un múltiplo de 6 nucleótidos como secuencia separadora, y al lado 3' de la misma se añade un ORF equivalente a 25 nucleótidos aproximadamente que incluye el codón de inicio ATG del ADNc deseado. Es preferible seleccionar 25 nucleótidos aproximadamente del ADNc deseado como la secuencia de ADN sintética del lado directo con el fin de que tenga G o C como último nucleótido en su extremo 3'.

En la secuencia de ADN sintética del lado inverso, se seleccionan dos o más nucleótidos (preferiblemente 4 nucleótidos excluyendo GCG y GCC, secuencias que se originan en el sitio de reconocimiento de NotI, más preferiblemente ACTT) del lado 5' del ADN sintético, a su lado 3' se añade el sitio de reconocimiento de NotI "gcggccgc" y a su lado 3' se añade a su vez un oligo ADN como fragmento de inserción para ajustar la longitud. Este oligo ADN es diseñado de tal manera que el número total de nucleótidos incluyendo el sitio de reconocimiento de NotI "gcggccgc", la secuencia complementaria del ADNc y la secuencia de nucleótidos EIS del genoma de SeV que se origina en el virus descrito a continuación sea un múltiplo de seis (la denominada "regla del seis"; Kolakofski, D. y col., 1998, J. Virol. 72:891-899). A su vez, al lado 3' del fragmento insertado, se añade una secuencia complementaria a la secuencia S del virus Sendai, preferiblemente 5'-CTTTCACCCT-3', la secuencia I, preferiblemente 5'-AAG-3' y una secuencia complementaria a la secuencia E, preferiblemente 5'-TTTTTCTTACTACGG-3', y posteriormente en el lado 3' de la misma, una secuencia complementaria equivalente de 25 nucleótidos aproximadamente contados en dirección inversa desde el codón de terminación de la secuencia de ADNc deseada cuya longitud es ajustada para que tenga como último nucleótido G o C, es seleccionada y añadida como extremo 3' del ADN sintético del lado inverso.

La PCR puede ser realizada según el método habitual con, por ejemplo, polimerasa ExTaq (Takara Shuzo). Preferiblemente, la PCR se realiza utilizando polimerasa Vent (NEB), y los fragmentos deseados así amplificados son digeridos con NotI e insertados posteriormente en el sitio de NotI del vector plasmídico pBluescript. Las secuencias de nucleótidos de los productos de la PCR así obtenidos son confirmadas con un secuenciador con el fin de seleccionar un plásmido que tenga la secuencia correcta. El fragmento insertado es escindido del plásmido utilizando NotI y clonado en el sitio de NotI del plásmido portador del ADNc genómico. Alternativamente, es posible también obtener ADNc del virus Sendai recombinante insertando directamente el fragmento en el sitio de NotI sin la mediación del vector plasmídico pBluescript.

La presente invención describe además que mediante la transferencia del ADN del vector vírico de esta invención a células huésped para su expresión en las mismas, es posible preparar un vector vírico que contenga un producto de transcripción del ADN del vector vírico en las partículas víricas. Específicamente, el ADN de un vector vírico de esta invención puede ser transferido a células huésped para expresar una proteína vírica en las células huésped. La transferencia del ADN del vector vírico a células huésped puede preceder la expresión de las proteínas víricas en las células huésped o viceversa, o bien estos procesos pueden ser llevados a cabo simultáneamente. Las proteínas víricas pueden ser expresadas en las células huésped transfiriendo al huésped, por ejemplo, vectores de expresión que codifiquen las proteínas víricas. Cuando se produce un ADN del vector vírico deficiente en los genes F, HN y/o M, con tal vector defectuoso no se forman partículas víricas infecciosas. Sin embargo, es posible formar partículas víricas infecciosas transfiriendo separadamente estos genes deficientes, genes que codifiquen otras proteínas de la envoltura del virus, etcétera, a las células huésped y expresándolos en las mismas.

Los métodos para transferir el ADN del vector vírico a las células incluyen los siguientes: 1) el método de preparación de precipitados de ADN que pueden ser captados por las células diana; 2) el método de preparación de un complejo conteniendo ADN que sea adecuado para ser captado por las células diana y que además no sea muy citotóxico y tenga carga positiva; y 3) el método de perforar instantáneamente poros en la membrana de las células diana lo suficientemente anchos para permitir que las moléculas de ADN pasen a través de los mismos mediante un pulso eléctrico.

En el Método 2) pueden utilizarse una variedad de reactivos de transfección, siendo ejemplos de los mismos DOTMA (Boehringer), SuperFect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. Un ejemplo del Método 1) es un método de transfección que utiliza fosfato de calcio, en el cual el ADN que entra en las células se incorpora a los fagosomas y también se incorpora una cantidad suficiente a los núcleos (Graham, F.L. y Van Der Eb, A.J., 1973, Virology 52:456; Wigler, M. y Silverstein, S., 1977, Cell 11:223). Chen y Okayama han investigado la optimización de la técnica de transferencia, informando que pueden obtenerse precipitados de ADN adecuados bajo condiciones en las cuales 1) las células son incubadas con ADN en una atmósfera de 2 a 4% de CO₂ a 35°C durante 15 a 24 horas, 2) se utiliza ADN circular con una actividad de formación de precipitados superior a la del ADN lineal y 3) la concentración de ADN en la mezcla del precipitado es de 20 a 30 µg/ml (Chen, C. y Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:2745). El Método 2) es adecuado para una transfección transitoria. En la técnica se conoce un método antiguo en el cual se prepara una mezcla de DEAE-dextrano (Sigma #D-9885, P.M. 5 x 10⁵) en una proporción de concentración de ADN deseada para llevar a cabo la transfección. Como la mayoría de los complejos se descomponen dentro de los endosomas, puede añadirse cloroquina para intensificar los efectos de la transfección (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3015). El Método 3) es referido como electroporación y es más versátil en comparación con los métodos 1) y 2), ya que no tiene selectividad celular. El Método 3) será eficaz bajo condiciones óptimas referidas a la duración de la corriente eléctrica del pulso, la forma del pulso, la potencia del campo eléctrico (distancia entre electrodos, voltaje), conductividad de los tampones, concentración de ADN y densidad celular.

Entre las tres categorías anteriormente descritas, se describen como idóneos los reactivos de transfección (método 2)), ya que el método 2) es fácilmente realizable y facilita el examen de muchas muestras de ensayo utilizando una gran cantidad de células. La invención describe además como utilizables SuperFect (QIAGEN #301305) o DOSPER (Boehringer #1811169).

La reconstitución de un virus a partir de ADNc puede ser realizada según métodos conocidos (WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A.P. y col., 1997, Virology 235:323-332; Whelan, S.P. y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8388-8392; Schnell, M.J. y col., 1994, EMBO J. 13:4195-4203; Radecke, F. y col., 1995, EMBO J. 14:5773-5784;

Lawson, N.D. y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4477-4481; Garcin, D. y col., 1995, EMBO J. 14:6087-6094; Kato, A. y col., 1996, Genes Cells 1:569-579; Baron, M.D. y Barrett, T., 1997, J. Virol. 71:1265-1271; Bridgen, A. y Elliott, R.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:15400-15404). Estos métodos permiten la reconstitución de vectores víricos de Paramyxoviridae, incluyendo vectores del virus de la parainfluenza, del virus del sarampión, del virus de la peste bovina y del virus Sendai, a partir de ADN.

Por ejemplo, células LLC-MK2, derivadas de riñón de simio, son cultivadas en placas de cultivo de plástico de 24 pocillos a 6 pocillos o en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, utilizando un medio mínimo esencial (MEM) conteniendo un 10% de suero de ternera fetal (FCS) y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin) hasta un 70-80% de confluencia e infectadas, por ejemplo, con virus vaccinia recombinante vTF7-3 que expresa polimerasa de T7 a 2 ufp/célula. Este virus puede ser inactivado por un tratamiento con radiación UV durante 20 minutos en presencia de 1 µg/ml de psoralén (Fuerst, T.R. y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126; Kato, A. y col., 1996, Genes Cells 1:569-579). La cantidad de psoralén añadida y el tiempo de irradiación UV pueden ser ajustados adecuadamente. Una hora después de la adsorción del virus, las células son transfectadas con 2 a 60 µg, más preferiblemente con 3 a 5 µg, del ADNc del SeV recombinante anteriormente descrito mediante el método de lipofección utilizando plásmidos (24 a 0,5 µg de pGEM-N, 12 a 0,25 µg de pGEM-P y 24 a 0,5 µg de pGEM-L, más preferiblemente con 1 µg de pGEM-N, 0,5 µg de pGEM-P y 1 µg de pGEM-L) (Kato, A. y col., 1996, Genes Cells 1:569-579) que expresan las proteínas víricas que actúan en trans requeridas para la producción del genoma de SeV de longitud completa junto con SuperFect (QIAGEN). Las células transfectadas son cultivadas en MEM sin suero conteniendo 100 µg/ml de rifampicina (Sigma) y 100 µg/ml de arabinósido de citosina (AraC) si se desea, más preferiblemente conteniendo únicamente 40 µg/ml de arabinósido de citosina (AraC) (Sigma), y las concentraciones de los reactivos son ajustadas a las concentraciones óptimas para minimizar la citotoxicidad debida al virus vaccinia y maximizar la tasa de reconstitución del virus (Kato, A. y col., 1996, Genes Cells 1:569-579). Después de cultivar durante 48 a 72 horas aproximadamente después de la transfección, las células son reconstituídas, rotas mediante tres ciclos repetidos de congelación y descongelación, transfectadas a células LLCMK2 y cultivadas. Después de cultivar las células durante 3 a 7 días, se recoge la solución de cultivo. Los vectores víricos deficientes en el gen que codifica la proteína de la envoltura sin capacidad de replicación pueden ser reconstituídos mediante la utilización de células LLCMK2 que expresen proteínas de la envoltura para la transfección, o mediante la transfección junto con un plásmido que exprese proteínas de la envoltura. Los vectores víricos deficientes pueden ser amplificados mediante el cultivo de las células transfectadas dispuestas sobre células LLCMK2 que expresen proteínas de la envoltura (PCT/JP00/03194 y PCT/JP00/03195). Puede determinarse el título de los virus contenidos en el sobrenadante del cultivo midiendo la actividad de hemoaglutinación (HA), que puede ser analizada mediante el "método de dilución de punto final" (Kato, A. y col., 1996, Genes Cells 1:569-579). La solución madre de virus así obtenida puede ser almacenada a -80°C sin envejecimiento.

El tipo de células huésped utilizadas para la reconstitución del virus no está particularmente limitado, siempre que un vector vírico pueda ser reconstituído en las mismas. Por ejemplo, en la reconstitución del vector SeV y similares, pueden utilizarse células en cultivo tales como células CVI y células LLCMK2 derivadas de riñón de simio, células BHK derivadas de riñón de hámster, células derivadas de humano, etcétera. Para obtener el vector SeV en gran cantidad, el vector puede ser amplificado mediante la infección del vector vírico obtenido a partir de las células huésped anteriormente descritas en huevos de gallina embrionados. Los métodos para producir virus utilizando huevos de gallina han sido ya desarrollados (Nakanishi y col. (eds.), 1993, "Shinkei-kagaku Kenkyu-no Sentan-gijutu Protocol III (High Technology Protocol III of Neuroscience Research), Molecular Neurocyte Physiology, Koseisha, Osaka, pp. 153-172). Específicamente, por ejemplo, huevos fertilizados son colocados en un incubador e incubados durante 9 a 12 días a 37-38°C para hacer crecer los embriones. El vector vírico es inoculado en la cavidad corioalantoidea de los huevos y cultivado durante varios días para hacer proliferar el virus. Condiciones tales como la duración del cultivo pueden ser variadas dependiendo del tipo de virus recombinante utilizado. Posteriormente, se recupera el fluido corioalantoideo que contiene el virus. La separación y purificación del vector SeV pueden ser llevadas a cabo según los métodos estándar (Tashiro, M., "Virus Experiment Protocols", Nagai and Ishihama (eds.), Medicalview, pp. 68-73 (1995)).

Además, el vector vírico de la invención puede tener en la superficie de su envoltura moléculas de adhesión, ligandos, receptores o fragmentos de los mismos con el fin de que se adhiera a células específicas. Si se preparan vectores conteniendo una proteína quimérica con estas proteínas en su dominio extracelular y un polipéptido derivado de la proteína de la envoltura del virus en su dominio intracelular, se facilitará la producción de un vector dirigido hacia un tejido particular. Estos factores pueden ser codificados por el propio genoma del virus, o suministrados en el momento de la reconstitución del virus a través de la expresión de genes distintos de los del genoma del virus (por ejemplo, otro vector de expresión o un cromosoma de la célula huésped).

Los genes víricos contenidos en el vector vírico recombinante pueden ser modificados, por ejemplo, para reducir la antigenicidad o incrementar la eficacia de la transcripción de ARN o la eficacia de la replicación. Específicamente, es posible modificar al menos uno de los genes N, P/C y L, que son genes de factores de replicación, para incrementar la transcripción o la replicación. Es también posible modificar la proteína HN, una proteína estructural que tiene actividad hemaglutinina y actividad neuraminidasa, con el fin de incrementar la estabilidad del virus en la sangre mediante el debilitamiento de la primera actividad y de regular la infectividad mediante la modificación de la última actividad. Es también posible modificar la proteína F, que está implicada en la fusión de membranas, con el fin de regular la capacidad de fusión de los liposomas fusionados a la membrana. Además, es posible generar un vector vírico de Paramyxoviridae que esté manipulado para que tenga una débil antigenicidad mediante el análisis de los

epítomos presentadores de antígeno de posibles moléculas antigénicas en la superficie celular tales como la proteína F y la proteína HN.

En la preparación de vectores víricos deficientes, dos vectores víricos diferentes deficientes en un gen de la envoltura diferente pueden ser transfectados en la misma célula. En este caso, cada proteína de la envoltura deficiente es suministrada a través de la expresión del otro complejo, y esta complementación mutua permite la generación de partículas víricas infectivas, que pueden replicarse y propagarse. Por tanto, dos o más de los vectores víricos de la presente invención pueden ser inoculados simultáneamente en una combinación tal que se complementen entre sí, produciendo de este modo una mezcla de cada uno de los vectores víricos deficientes en proteínas de la envoltura con bajo coste y a gran escala. Como tales virus carentes de un gen de la envoltura tienen un genoma más pequeño, pueden permitir la inserción de un gen foráneo largo. Además, es difícil que estos virus, que son intrínsecamente no infectivos, mantengan el estatus de coinfección después de ser diluidos fuera de las células, y por tanto están esterilizados y son menos nocivos para el entorno.

La presente invención describe además que al aplicar un vector vírico así obtenido en terapia génica, es posible expresar un gen foráneo con cuyo tratamiento se esperen efectos, o un gen endógeno cuyo suministro sea insuficiente en el organismo de un paciente, mediante la administración directa o indirecta (*ex vivo*) del vector vírico. No hay una limitación particular con respecto al tipo de gen foráneo, que puede ser, además de ácidos nucleicos que codifiquen proteínas, ácidos nucleicos que no codifiquen una proteína tales como un antisentido o un ribozima. No existe una limitación particular sobre el tipo de proteínas codificadas por los genes foráneos, y ejemplos de proteínas naturales son hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, receptores, enzimas, péptidos, etc. Estas proteínas pueden ser proteínas secretoras, proteínas de membrana, proteínas citoplásmicas, nucleoproteínas, etc. Ejemplos de proteínas artificiales son proteínas de fusión tales como toxinas quiméricas, proteínas negativas dominantes (incluyendo moléculas solubles de receptores o de receptores negativos dominantes que se unen a membranas), moléculas de adhesión celular de tipo delección y moléculas de la superficie celular. Estas proteínas pueden ser unas a las cuales se haya añadido una señal de secreción, una señal de localización de membranas, una señal de localización nuclear, etc. Es posible también suprimir funciones de genes indeseables expresados en las células de riñón mediante la expresión de una molécula de ARN antisentido o de un ribozima que corte ARN, etc. Los objetos de la terapia génica descritos en la presente pueden incluir terapia del cáncer, llevada a cabo por la expresión de, por ejemplo, un gen que cause la muerte celular tal como un gen suicida (tk de HSV, etc.) que presente toxicidad para las células infectadas. Otro ejemplo es la terapia preventiva para restenosis de las arterias coronarias debida a esclerosis arterial. Además, se describe que la aplicación de un vector vírico en terapia génica dirigida a mantener la supervivencia celular puede incluir la complementación con productos génicos de genes tales como el gen de la adenosina desaminasa (ADA), el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), etcétera, que se sabe que han sido eliminados o son defectuosos en enfermedades monogénicas, etc.

Independientemente de si el objetivo de la terapia génica es producir muerte celular o mantener la supervivencia celular, la presente invención describe además que vectores que contienen ARN como genoma pueden ser aplicados en una amplio rango de enfermedades, ya que no son convertidos en ADN durante los procesos de transcripción y autoreplicación de los mismos, y también porque es poco probable que se incorporen a los cromosomas de las células reproductoras y demás, afectando a los genes de las siguientes generaciones. Esto es, los vectores pueden ser aplicados a enfermedades causadas por muchos genes tales como hipertensión, diabetes mellitus, asma, enfermedad isquémica cardíaca, etcétera, para tratamientos y prevención en muchos sujetos sanos, tales como vacunas, y vacunación para prevenir diferentes enfermedades infecciosas tales como SIDA, malaria, gripe, etc.

Se describe además que el vector vírico puede ser producido como una composición junto con un vehículo deseado, farmacéuticamente aceptable. En la presente, se define un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como aquellos materiales que pueden ser administrados con un vector pero que no inhiben la transferencia de genes llevada a cabo por el vector. Por ejemplo, el vector vírico puede ser diluido apropiadamente con solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), etcétera, para producir una composición. Si el vector vírico es propagado en huevos de gallina y tal, la composición puede contener un fluido corioalantoideo. Además, la composición puede contener vehículos tales como agua desionizada o una solución acuosa de dextrosa al 5%. Puede contener además estabilizantes, antibióticos o similares. La composición conteniendo el vector vírico descrito puede ser administrada a cualquier mamífero incluyendo humanos, monos, ratones, ratas, conejos, ovejas, ganado, perros, etc.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la construcción del plásmido pSeV18c(+) y la inserción del gen de la luciferasa en la región corriente abajo del ORF de N. Un fragmento de 18 nucleótidos diseñado para contener un sitio de NotI fue insertado entre los nucleótidos 1698 y 1699 del extremo 3' del genoma de SeV en pSeV(+) mediante mutagénesis dirigida a un sitio (Shioda, T. y col., 1983, Nucleic Acids Res. 11:7317-7330). El plásmido resultante que codifica el antígeno de SeV con la inserción de 18 nucleótidos fue denominado pSeV18c(+). El ORF del gen de la luciferasa fue amplificado por PCR con 4 grupos de cebadores marcados con NotI (ESn/NotLr, ESp/NotLr, ESf/NotLr y ESI/NotLr) a partir del plásmido molde pHvLuc-RT4 (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579) para generar los fragmentos que contenían cada uno de ellos las diferentes secuencias S naturales colocadas en la cabeza del gen de la luciferasa. Estos fragmentos amplificados fueron digeridos con NotI e introducidos en el mismo sitio de pSeV18c(+). Los plásmidos resultantes, denominados pSeV(+)SnLuc, pSeV(+)SpLuc, pSeV(+)SfLuc y pSeV(+)SILuc, fueron utilizados para recuperar los SeV/SnLuc, SeV/SpLuc, SeV/SfLuc y SeV/SILuc recombinantes, respectivamente.

La Figura 2 muestra la construcción génica de SeV.

La Figura 3 muestra la expresión de luciferasa por SeV/SpLuc, SeV/SnLuc, SeV/SfLuc y SeV/SILuc. Los virus recombinantes fueron inoculados a células CV1 a una moi de 10 (ufp/célula). Las actividades luciferasa fueron medidas a los tiempos indicados (horas).

La Figura 4 es una fotografía y una gráfica que muestran la expresión de luciferasa por el SeV recombinante. Los virus recombinantes fueron inoculados en células CV1 a una moi de 100 (ufp/célula). Las células fueron cultivadas en presencia de cicloheximida durante 12 horas. Se recogieron porciones de células para preparar ARN y fueron sondadas con la sonda de luciferasa (parte superior). Las células restantes fueron incubadas adicionalmente durante 0, 2 y 4 horas sin cicloheximida para permitir la síntesis de proteínas y se midió la actividad luciferasa (parte inferior).

La Figura 5 muestra la cinética de crecimiento de SeV/mSf. Los títulos de SeV de tipo salvaje y del SeV/mSf mutante fueron medidos a los puntos de tiempo indicados bajo condiciones de un solo ciclo. Las barras en blanco y las barras rellenas representan unidades de hemoaglutinación (UHA) de los virus de tipo salvaje y mutantes, respectivamente. Las líneas con círculos en blanco y con círculos rellenos representan ufp por ml de los virus de tipo salvaje y mutantes, respectivamente.

La Figura 6 es una fotografía que muestra la citopatogenicidad de SeV/mSf. Células CV1 fueron infectadas con el virus de tipo salvaje o con el virus SeV/mSf a una moi de 20 (ufp/célula) en presencia (+) y ausencia (-) de tripsina. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de la infección.

La Figura 7 es una fotografía que muestra la expresión intracelular de genes víricos. Células CV1 infectadas con el virus SeV de tipo salvaje o con el virus SeV/mSf fueron analizadas mediante hibridación Northern con sondas de los genes víricos N, P, F o L a varios tiempos (horas) después de la infección. Están marcadas las posiciones de los ARNs y del ARN genómico/antigenómico (ARNv).

La Figura 8 es una fotografía que muestra la expresión intracelular de genes víricos. La expresión intracelular de los genes víricos en células CV1 fue analizada en una transferencia Western con un anticuerpo anti-SeV a varios tiempos (horas) indicados en la parte superior de cada calle.

La Figura 9 es una fotografía que muestra la expresión intracelular de genes víricos. Células CV1 fueron infectadas con SeV de tipo salvaje y con SeV/mSf a una moi de 100 ufp en presencia de cicloheximida. Los ARNs fueron extraídos 12 horas después de la inoculación y analizados mediante hibridación Northern. Las bandas específicas obtenidas fueron analizadas utilizando el Analizador de Imagen BAS 2000.

La Figura 10 es una fotografía que muestra ensayos de competición de los virus SeV de tipo salvaje y SeV/mSf en copases seriados. (A) Los conjuntos de cebadores específicos (izquierda) para detectar cada uno de los ARNs víricos (derecha). (B) Cada pase fue iniciado con dosis de entrada de 10^4 (SeV/mSf) y 10^4 (SeV de tipo salvaje) ufp/huevo o 10^4 (SeV/mSf) y 10^2 (SeV de tipo salvaje) ufp/huevo. Los fluidos corioalantoideos fueron recogidos cada 3 días, diluidos hasta 10^{-6} y coinoculados en nuevos huevos de manera seriada hasta 10 pases. Los ARNs víricos fueron extraídos y analizados mediante el método de RT-PCR de una etapa utilizando los conjuntos de cebadores específicos. El número de pase está mostrado en la parte superior de cada calle. "Tipo salvaje" y "SeV/mSf" representan fragmentos de ADN amplificados mediante la utilización de conjuntos de cebadores específicos para las secuencias respectivas.

La Figura 11 muestra la ganancia de peso corporal de ratones BALB/c normales y de ratones BALB/c con timo deficiente (nu/nu) infectados con los virus SeV de tipo salvaje y SeV/mSf. Cinco ratones fueron inoculados intranasalmente con varias dosis de virus (10^4 a 10^7 ufp por ratón). La ganancia de peso de los ratones fue medida en gramos cada día hasta 14 días después de la inoculación. Los ratones muertos están marcados con una †.

La Figura 12 muestra lesiones pulmonares y cargas víricas en los pulmones de ratones BALB/c y BALB/c (nu/nu). Cada ratón fue inoculado intranasalmente con 10^4 ufp de los virus. Estos ratones fueron sacrificados 0, 1, 2, 3, 5, 7 y 9 días después de la inoculación para clasificar las valoraciones de las lesiones (parte superior) y determinar los títulos de virus en los pulmones (parte inferior). Estos valores se muestran todos individualmente para cada ratón.

Modo mejor de llevar a cabo la invención

La presente invención será explicada con detalle a continuación con referencia a Ejemplos, pero no debe ser considerada como limitada a los mismos.

Ejemplo 1

Construcción de virus recombinantes y ensayo de luciferasa

Los nueve nucleótidos de la secuencia E de SeV están conservados exactamente en todos los genes. Por otra parte, existen pequeñas diferencias en los nueve nucleótidos de la secuencia S. Mientras que las secuencias S de tres (P, M y HN) de seis genes son 3'-UCCACUUU-5', las de los genes N, F y L son 3'-UCCACgUUU-5', 3'-UCCACuaUUU-5' y 3'-UCCACUUa-5', respectivamente (Fig. 2). Estas pequeñas diferencias están completamente

conservadas en todas las cepas de SeV, independientemente de la historia de pases, la virulencia y la estrategia de aislamiento. Para examinar la función de estas pequeñas diferencias de S, los inventores crearon los cuatro SeVs recombinantes denominados SeV/SpLuc, SeV/SnLuc, SeV/SfLuc y SeV/SILuc que expresan la luciferasa bajo el control de la secuencia S sintética.

5

1-1. Creación de un sitio de inserción después del ORF de N

El plásmido pSeV(+) que contenía la copia de ADNc del antigenoma de SeV de longitud completa (Kato A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579) fue utilizado como material de partida para la construcción de plásmidos. Con el fin de insertar un gen de luciferasa con una secuencia E sintética y una secuencia S sintética, se creó un único sitio de NotI corriente abajo del ORF de N en el gen N. Se insertaron 18 nucleótidos (5-gagggcccgccgcccga-3'/SEC ID N°: 1) que contenían el sitio de restricción de NotI entre los nucleótidos 1698 y 1699 del extremo 3' del genoma de SeV que estaba situado en la región 5' no codificadora (en el sentido negativo) del gen N según se muestra en la Fig. 1 (Shioda, T. y col., 1983, Nucleic Acids Res. 11:7317-7330). Para la inserción, los inventores utilizaron mutagénesis dirigida a un sitio mediante el método de la extensión de cebadores solapantes mediada por PCR (Ho, S.N. y col., 1989, Gene 77:51-59) de acuerdo esencialmente con una publicación previa (Hasan, M.K. y col., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820). Brevemente, se sintetizaron dos cebadores (NmF; 5'-gagggcccgccgcccga¹⁶⁹⁹TACGAGGCTTCAAGGTACTT¹⁷¹⁸-3'/SEC ID N°: 2 y NmR; 5'-tcgcgcccgccgcccctc¹⁶⁹⁸TGATCCTAGATTCTC CTAC¹⁶⁷⁰-3'/SEC ID N°: 3) con extremos que tenían 18 nucleótidos solapantes, y dos cebadores externos (OP1, 5'-⁶¹CAAAGTATCCACCACCCTGAGGAGCAGGTT CCAGACCCTTGGCTTTG¹⁰⁵-3'/SEC ID N°: 4 y OP2, 5'-²⁴⁶⁷TTAAGTTGGTVAGTGACTC²⁴⁴⁹-3'/SEC ID N°: 5). Las primeras PCRs se llevaron a cabo con los pares de cebadores OP1/NmF y los pares de cebadores OP2/NmF utilizando como molde el pSeV(+) para dar lugar a fragmentos de 1,6 kb y 0,8 kb, respectivamente. Una segunda PCR se llevó entonces a cabo con los pares de cebadores OP1/OP2 utilizando los fragmentos de 1,6 kb y 0,8 kb purificados como molde para generar el fragmento individual de 2,4 kb con los 18 nucleótidos. El fragmento de 2,4 kb fue purificado y digerido con SphI y SalI. El plásmido pSeV(+) fue cortado en las posiciones 610 y 2070 del genoma del SeV por estas enzimas. La secuencia del fragmento de 1,47 kb resultante fue verificada mediante secuenciación utilizando un secuenciador de ADN automatizado AFLII (Pharmacia, Uppsala) y sustituido por el fragmento correspondiente del pSeV(+) parental, generándose de este modo pSeV18c(+) que contenía un solo (único) sitio de restricción después del ORF de N.

30

De la misma manera que el plásmido parental pSeV(+), virus recombinantes pueden ser reconstituidos a partir del plásmido así obtenido que tenía un inserto de 18 nucleótidos conteniendo un sitio de restricción de NotI. La infectividad y la capacidad de replicación de los virus generados eran también similares a las del pSeV(+) parental.

35

1-2. Inserción en el vector del gen de la luciferasa regulado por varias secuencias S

El gen de la luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) derivado del pHVlucRT4(-) (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579) fue amplificado mediante PCR con los cuatro pares de cebadores siguientes correspondientes a las cuatro secuencias de S diferentes; cuatro cebadores directos (ESp; 5'-TTgcccgcGTAAGAAAACTTAGGG GAAAGTTCACCTTACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3'/SEC ID N°: 6, ESn; 5'-TTgcccgcGTAAGAAAA CTTAGGGTcAAAGTTCACCTTACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3'/SEC ID N°: 7, ESf; 5'-TTgcccgcGTA GAAAACTTAGGGatAAAGTTCACCTTACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3'/SEC ID N°: 8, ES1; 5'-TTgcccgcGTAAGAAAACTTAGGGTGAAtGTTTCACTTACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3'/SEC ID N°: 9) y un cebador inverso común (NotLr; 5'-TCgcccgcGATTACAATTTGGA CTTTCCG-3'/SEC ID N°: 10). Está subrayado un nuevo conjunto de secuencias E y secuencias S del SeV conectadas con el trinucleótido intergénico conservado y las letras minúsculas sin subrayar representan el sitio de restricción de NotI. Las letras en minúsculas subrayadas representan cada una de ellas los nucleótidos únicos de los cebadores. Los fragmentos de 1,7 kb amplificados con los pares de cebadores ESp/NotLr, ESn/NotLr, ESf/NotLr y ES1/NotLr fueron purificados, digeridos con NotI e introducidos directamente en el sitio de NotI de pSeV18c(+) (Fig. 1). Las construcciones finales fueron denominadas pSeV(+)/SpLuc, pSeV(+)/SnLuc, pSeV(+)/SfLuc y pSeV(+)/SILuc, respectivamente, de acuerdo con la secuencia de S utilizada.

55

1-3. Recuperación de virus a partir de los ADNc

Se recuperaron virus a partir de ADNc de acuerdo esencialmente con procedimientos previamente descritos (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579). Brevemente, 2 x 10⁶ células LLCMK2 en una placa de 6 cm de diámetro fueron infectadas con virus vaccinia (VV), vTF7-3, una donación del Dr. B. Moss (Fuerst, T.R. y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126) a una moi de 2 ufp/célula. Posteriormente, 10 µg de pSeV(+) parental o mutado y los plásmidos que codificaban las proteínas que actúan en trans, pGEM-N (4 µg), pGEM-P (2 µg) y pGEM-L (4 µg) (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579) fueron transfectados simultáneamente con la ayuda del reactivo de lipofección DOTAP (Boehringer-Mannheim, Mannheim). Las células fueron mantenidas en MEM sin suero en presencia de 40 µg/ml de araC (1-β-D-arabinofuranosilcitosina) y 100 µg/ml de rifampicina con el fin de minimizar la citopatogenicidad del VV y maximizar de este modo la tasa de recuperación. Cuarenta horas después de la transfección, se recogieron las células, se rompieron mediante tres ciclos de congelación y descongelación y se inocularon en huevos de gallina embrionados de 10 días de edad. Después de 3 días de incubación, se recogió el fluido corioalantoideo. Los títulos de los virus recuperados fueron expresados en unidades de hemoaglutinación (UHA) y ufp/ml según se describió previamente (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579). El VV cooperador que contaminaba el fluido corioalantoideo de los huevos, que contenía de 10⁸ a 10⁹ ufp/ml de los SeVs recuperados, fue eliminado por la segunda

65

propagación en huevos a una dilución de 10^{-7} . Estos fluidos del segundo pase, almacenados a -80°C , fueron utilizados como virus simiente para todos los experimentos.

1-4. Cultivos celulares e infección vírica

5 Las líneas celulares derivadas de riñón de mono LLCMK2 y CV1, fueron cultivadas en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal a 37°C . Cultivos en monocapa de estas células fueron infectadas con los virus mutantes recuperados a partir de los ADNc a una moi inicial de 10 ufp/célula, y mantenidos en MEM sin suero. El SeV de tipo salvaje (cepa Z) recuperado a partir del ADNc (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 10 1:569-579) fue utilizado como control.

Se encontró que los cuatro virus recombinantes se habían replicado más lentamente que el virus de tipo salvaje en las células CV1, debido probablemente a la acomodación de un gen extra tan largo como de 1.728 nucleótidos (Hasan, M.K. y col., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820). Entre los cuatro recombinantes, SeV/SfLuc fue el que se replicó más 15 lentamente.

1-5. Ensayo de la luciferasa

Las actividades luciferasa expresadas por los SeVs recombinantes fueron comparadas entre sí. La expresión de 20 la actividad luciferasa por SeV fue estudiada en 5×10^5 células CV1/pocillo en placas de 6 pocillos a varias multiplicidades iniciales, de 1 a 300 ufp por célula. Bajo condiciones de crecimiento de un único ciclo, las células fueron recogidas 0, 6, 14, 20 y 26 horas después de la infección (p.i.). La actividad luciferasa de las células recogidas fue medida mediante un kit de ensayo de luciferasa (Promega, Madison) con un luminómetro (Luminos CT-9000D, DIALATRON, Tokio) según se describió anteriormente (Hasan, M.K. y col., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820; Kato, A. y 25 col., 1996, Genes to Cells 1:569-579).

La actividad luciferasa expresada por los SeVs aumentaba de acuerdo con el tiempo de infección y la dosis infecciosa en todos los recombinantes. La Figura 3 muestra los cambios de la actividad luciferasa cuando los virus fueron infectados a una moi de 10 en células CV1. 30

Estas células fueron recogidas y se llevó a cabo una hibridación Northern mediante la utilización de ADNc de luciferasa como sonda. La hibridación Northern se realizó según sigue. Se extrajeron los ARNs de las células utilizando TRIZOL (Gibco BRL, N.Y.). Los ARNs fueron precipitados con etanol, disueltos en una solución de formamida/formaldehído, sometidos posteriormente a electroforesis en geles de agarosa 0,9%-formamida/MOPS y transferidos capilarmente a filtros Hibond-N (Amersham, Buckinghamshire). Los filtros fueron sondados con sondas marcadas con ^{32}P producidas mediante el kit de marcaje "Multi-Prime" (Amersham, Buckinghamshire). Para la sonda de luciferasa, el fragmento NarI/HincII (1270 pb) fue purificado a partir de pHvLucRT4 (Kato, A. y col., 1996, Genes to Cells 1:569-579). Se verificó que los ARNs de la luciferasa fueron sintetizados como ARNs monocistrónicos. 35

Estos datos demostraban inequívocamente que la secuencia E y la secuencia S sintéticas insertadas justo antes del ORF de la luciferasa eran reconocidas de manera correcta por la ARN polimerasa del virus. Sin embargo, había diferencias en la actividad luciferasa de las células infectadas con estos cuatro virus incluso bajo la misma condición. La actividad más elevada se obtuvo con SeV/SILuc y la menor actividad con SeV/SfLuc 26 horas p.i. (Fig. 3). Los SeV/SpLuc y SeV/SnLuc fueron ligeramente menores que SeV/SILuc a las 26 horas p.i. Sin embargo, esto no se observó a las 14 y a las 20 horas p.i. Por tanto, las capacidades de reinicio de Sp, Sn y Sl fueron consideradas comparables. 40 45

Ejemplo 2

Comparación de los niveles de transcripción primaria de los virus recombinantes

50 Con el fin de comprobar si las diferencias en los niveles de expresión entre los cuatro SeVs recombinantes observadas en el Ejemplo 1 eran o no producidas principalmente a nivel de transcripción, pero no en el proceso de replicación, se incubaron células CV1 infectadas con los recombinantes en presencia de cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas y por tanto bloquea la replicación vírica que requiere síntesis de proteínas víricas *de novo*. Bajo estas condiciones, se permitía únicamente la transcripción primaria vírica catalizada por la ARN polimerasa asociada a los viriones. 55

De manera similar a la del Ejemplo 1, células CV1 fueron infectadas con los virus recombinantes a una moi de 100, y las células infectadas fueron incubadas en presencia de $100 \mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (Sigma, St. Louis) durante 60 12 horas. El ARN de las células infectadas fue preparado según se describió anteriormente, y la hibridación Northern se llevó a cabo utilizando como sonda el ADNc de la luciferasa (Fig. 4, parte superior). Se incubó un lote diferente de células para sintetizar proteínas en ausencia de cicloheximida durante 0, 2 y 4 horas, y se midió la actividad luciferasa.

Como resultado, en todas las células infectadas con cualquiera de los virus recombinantes, se encontró que cuanto mayor era el periodo de incubación después de la retirada de cicloheximida, mayor era la actividad luciferasa. Sin embargo, la expresión de luciferasa en las células infectadas con SeV/SfLuc fue de nuevo significativamente menor que con los otros tres (Fig. 4, parte inferior). La cantidad de ARNm de luciferasa en cada una de las células infectadas con virus se correlacionaba bien con la actividad luciferasa. Las actividades luciferasa a las 4 horas de incubación 65

fueron normalizadas por el recuento de SeV/SpLuc, ya que este tipo de secuencia S está compartida con tres de los seis genes. Las actividades luciferasa en las células infectadas con SeV/SnLuc y con SeV/SILuc fueron 0,86 y 1,19, respectivamente, y por tanto casi comparables a la de las células infectadas con SeV/SpLuc. En contraste, el valor de las células infectadas con SeV/SfLuc alcanzó solamente un 0,24 del control.

Estos resultados sugerían contundentemente que la señal utilizada para la expresión del gen F posee un potencial de reinicio menor que las otras secuencias de S.

Ejemplo 3

Mutante de SeV conteniendo una secuencia S modificada para el gen F

Los resultados anteriormente descritos sugerían que existe una disminución regulada de la transcripción en el gen F en el contexto del genoma natural del SeV. Para investigar esto, los inventores crearon a continuación un SeV mutante, el SeV/mSf, cuya secuencia S del gen F fue sustituida por la del gen P/M/HN, según se describe a continuación, y compararon su replicación con la del tipo salvaje.

3-1. Mutagénesis para modificar la secuencia S del gen F en el ADNc del SeV de longitud completa

Se llevaron a cabo sustituciones de dos nucleótidos en la secuencia S del gen F según sigue. En primer lugar, pSeV(+) fue cortado por BanIII en las posiciones de SeV 2088 y 5333 en el genoma del SeV, y el fragmento de 3,4 kb resultante fue clonado de nuevo en el mismo sitio de restricción de pBluescript KS(+) (Stratagene, La Jolla) para producir un pB/BanIII. Posteriormente, se llevó a cabo mutagénesis dirigida a un sitio mediante el método de extensión de cebadores solapantes mediada por PCR (Ho, S.N. y col., 1989, *Gene* 77:51-59) según se describió anteriormente utilizando dos cebadores sintetizados (mGS1F; 5'-⁴⁸¹⁰CTTAGGGTGAAAGTCCCTTGT⁴⁸³⁰-3'/SEC ID N°: 11 y mGS1R; 5'-⁴⁸³⁰ACAAGGGACTTTTACCCTAAG⁴⁸¹⁰-3'/SEC ID N°: 12) y dos cebadores externos (M1F; 5'-³⁹³¹TACCCATAGGTGTGGCCAAAT³⁹⁵¹-3'/SEC ID N°: 13 y T7; 5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'/SEC ID N°:14). Las letras subrayadas son los puntos mutagenizados. Las primeras PCRs realizadas con los pares de cebadores M1F/mGS1R y los pares de cebadores T7/mGS1F utilizando como molde pB/BanIII, produjeron un fragmento de 0,9 kb y un fragmento de 0,6 kb, respectivamente. Estos dos fragmentos fueron purificados y se llevó a cabo posteriormente la segunda PCR con los pares de cebadores M1F/T7 utilizando como moldes los fragmentos purificados, produciéndose un único fragmento de 1,5 kb con las mutaciones de los dos nucleótidos. Este fragmento fue purificado y digerido con BanIII y clonado de nuevo en el mismo sitio de restricción de pSeV(+) para producir un pSeV(+)-mSf. La secuencia clonada fue verificada mediante secuenciación de nucleótidos. Los virus fueron reconstituidos a partir del ADNc mediante los mismos procedimientos del Ejemplo 1.

La proliferación de este virus fue examinada utilizando células CV1. Se encontró que SeV/mSf crecía más rápidamente que el SeV de tipo salvaje en las células CV1 (Fig. 5). En ausencia de tripsina, se observaron células redondas y células desprendidas. En presencia de tripsina exógena para activar proteolíticamente la glicoproteína F, se observaron más células fusionadas para el SeV/mSf que para el tipo salvaje (Fig. 6).

3-2. Expresión de los genes de SeV/mSf

Se analizaron los niveles de ARNm de las células CV1 infectadas con el tipo salvaje y con SeV/mSf a una moi = 10 mediante transferencia Northern, igual que en el Ejemplo 1, a varias horas p.i. Para la sonda de N del virus Sendai, el fragmento PstI/PvuI (1189 pb) fue purificado a partir del pGEM-N y utilizado. Para la sonda de P, se purificó el fragmento SmaI/SmaI de 792 pb a partir del pGEM-P y se utilizó. Para las sondas de M, F, HN y L, se purificaron y usaron los fragmentos NdeI/NdeI (878 pb), BamHI/BamHI (902 pb), ScaI/ScaI (1108 pb) y BamHI/BamHI (1654 pb) del pSeV(+), respectivamente.

Según se muestra en la Fig. 7, los transcritos de F y L procedentes de SeV/mSf fueron detectados antes y alcanzaron niveles notablemente superiores, en comparación con la infección con el tipo salvaje. Los transcritos de P y N fueron también detectados antes en la infección con SeV/mSf, aunque los niveles máximos fueron comparables a los del tipo salvaje.

Con el fin de confirmar la expresión de proteínas víricas en las células infectadas, se llevó a cabo una transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-SeV. Células CV1 (2×10^5) cultivadas en placas de 6 pocillos fueron infectadas a una moi de 10 con el virus de tipo salvaje o con SeV/mSf y recogidas varias horas después de la infección. Las células fueron centrifugadas y los aglutinados celulares fueron lisados y procesados en SDS 12,5%-PAGE (Laemmli, U.K., 1970, *Nature* 227:680-685) y analizados mediante transferencia Western con suero de conejo anti-SeV según está descrito (Kato, A. y col., 1995, *Virology* 209:480-488; Kato, A. y col., 1996, *Genes to Cells* 1:569-579). Como resultado, los niveles de proteína F₀ en las células infectadas con SeV/mSf fueron significativamente mayores que en las células infectadas con el tipo salvaje (Fig. 8) en cualquier punto de tiempo a lo largo de la infección. Los productos de los genes corriente abajo, HN y L, no se separaron bien en este experimento.

Con el fin de comparar directamente el nivel de transcripción, después de que las células infectadas con SeV de tipo salvaje o con SeV/mSf fueran tratadas con cicloheximida para bloquear la síntesis de proteínas *de novo*, se extrajeron los ARNs de las células y se analizaron mediante hibridación Northern igual que anteriormente. Las radiactividades del

ARN genómico vírico contenido en las bandas hibridadas fueron analizadas utilizando el Analizador de Imagen BAS 2000 (Fujifilm, Tokyo). En el SeV mutante se observó también claramente una expresión incrementada de los genes F y L, pero no de los genes N y P (Fig. 9). Estos resultados demostraban una vez más inequívocamente que la secuencia S existente de forma natural para la transcripción del gen F posee una actividad de reinicio menor y por tanto disminuye de manera regulada la expresión de F y de los genes corriente abajo. Por tanto, se demostró también que puede incrementarse el nivel de transcripción no sólo del gen F sino también de los genes corriente abajo del mismo mediante la sustitución de la secuencia S del gen F por una que tenga una eficacia elevada. Debido probablemente a la expresión incrementada del gen L en el SeV/mSf, los niveles de ARN del virión (v) fueron mayores para el mutante que para el tipo salvaje a lo largo de toda la infección (Fig. 7). La detección más temprana de los ARNs en las células infectadas con el SeV mutante, según se demuestra en la Fig. 7, podría ser debida también a la expresión incrementada del gen L.

Ejemplo 4

Copases sucesivos del SeV de tipo salvaje y de SeV/mSf en huevos de gallina embrionados

Aunque el SeV de tipo salvaje se replicaba más lentamente que el SeV/mSf en células CV1 bajo condiciones de un solo ciclo según se muestra en la Fig. 5, quedaba todavía la posibilidad de que, cuando se cultivaran lentamente en condiciones de múltiples ciclos, la disminución regulada que tiene lugar de forma natural de la transcripción del gen F y de los genes corriente abajo fuera más ventajosa que el incremento regulado introducido artificialmente. Los inventores examinaron por tanto si el SeV de tipo salvaje o el SeV/mSf competirían entre sí bajo las condiciones de múltiples ciclos de copases sucesivos de los dos virus en huevos.

El SeV/mSf y el SeV de tipo salvaje fueron coinoculados en dos huevos de gallina embrionados con las dosis respectivas de 10^4 ufp/huevo (inoculación $10^4:10^4$) y en otro experimento con 10^4 y 10^2 ufp/huevo (inoculación $10^4:10^2$). Cada tres días después de la inoculación, se recogieron los fluidos corioalantoideos y después de una dilución a 10^{-6} , se reinocularon en nuevos huevos 0,1 ml de los mismos. Estas reinoculaciones fueron repetidas sucesivamente 10 veces. Los ARNs víricos fueron extraídos de cada fluido corioalantoideo utilizando TRIzol/LS (Gibco BRL, N.Y.) como en el Ejemplo 1, y amplificados mediante RT-PCR de una etapa con dos conjuntos de cebadores específicos. Los virus cultivados en los fluidos corioalantoideos fueron medidos semicuantitativamente mediante RT-PCR con pares de cebadores específicos. Un par de cebadores fue diseñado para amplificar solamente los fragmentos que tuvieran la secuencia S de tipo salvaje para el gen F (AGGGatAAAG) y la otra secuencia mutante (AGGGtgAAAG) (Fig. 10A). Específicamente, el ARN fue extraído de 25 μ l de cada fluido corioalantoideo y transcrito de manera inversa con el cebador HvM ($5'$ -⁴⁴⁴⁸TTTTCTCACTGGGTTAATC⁴⁴⁶⁷-3'/SEC ID N°: 15) a 50°C durante 30 minutos utilizando Superscript II (Gibco BRL, N.Y.), y desnaturalizado por calor a 94°C durante 2 minutos. Los ADNcs fueron amplificados por PCR con los cebadores HvM y GS2WR ($5'$ -⁴⁸³⁶GCACTCACAAGGGACTTTca⁴⁸¹⁷-3'/SEC ID N°: 16) para SeV/mSf y con los cebadores HvM y GS2MR ($5'$ -⁴⁸³⁶GCACTCACAAGGGACTTTat⁴⁸¹⁷-3'/SEC ID N°: 17) para el SeV de tipo salvaje según ha sido descrito previamente (Kato, A. y col., 1997, EMBO J. 16:578-587; Kuronati, A. y col., 1998, Genes Cells 3:111-124). Las letras en minúscula representan dinucleótidos mutados. Los productos específicos respectivos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa según está descrito.

Se encontró que el genoma de tipo salvaje había desaparecido hacia el octavo pase en el caso de la inoculación $10^4:10^4$ y hacia el quinto pase después de la inoculación $10^4:10^2$ (Fig. 10B). En experimentos control, cada virus fue pasado individualmente y se determinaron las secuencias del genoma. Los resultados indicaban que ambos genomas víricos se mantenían de manera estable durante 10 pases sucesivos sin ningún cambio de nucleótidos en las regiones secuenciadas. Estos datos indicaban que la secuencia S del gen F existente en la naturaleza no confería al SeV ninguna ventaja para la replicación, al menos *in ovo* bajo las condiciones de múltiples ciclos.

Ejemplo 5

Virulencia de SeV/mSf en ratones

Se requieren condiciones muy complicadas para que el SeV presente virulencia en un huésped natural tal como el ratón a nivel individual, en comparación con células cultivadas o huevos. Se examinó si el mutante SeV/mSf se replicaba antes que el tipo salvaje y mostraba mayor virulencia en ratones.

Ratones BALB/c de 3 semanas de edad y ratones BALB/c desnudos (nu/nu) de 4 semanas de edad libres de patógenos específicos (SPF) fueron adquiridos a Charles-River, Japón, y utilizados para los experimentos de infección con virus. Estos ratones fueron infectados intranasalmente con 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ó 10^8 ufp/ratón de virus de tipo salvaje o de SeV/mSf bajo una leve anestesia con éter (Kiyotani, K. y col., 1990, Virology 177:65-74). Se midieron sus pesos corporales individualmente cada día hasta un total de 14 días. A los 0, 1, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección, se sacrificaron tres ratones de cada grupo y se midieron los títulos de virus en los pulmones de los ratones BALB/c y desnudos inoculados con 10^4 ufp. Se valoraron las lesiones pulmonares al mismo tiempo (Kato, A. y col., 1997, EMBO J. 16:578-587). Los resultados están mostrados en la Fig. 11.

La ganancia de peso corporal de los ratones fue enormemente alterada por las inoculaciones de 10^7 ufp de ambos virus. Los dos virus mataron a todos los ratones en días similares después de la infección. A 10^6 ufp se encontraron diferencias significativas entre los dos virus. El SeV/mSf afectaba más potentemente la ganancia de peso corporal en comparación con el tipo salvaje. El primero mató a todos los ratones mientras que el segundo mató únicamente a uno

ES 2 288 866 T3

y permitió que los ratones restantes ganaran peso de nuevo. A 10^5 ufp todos los ratones infectados con el tipo salvaje mostraron un patrón de ganancia de peso casi comparable con el de los ratones infectados de manera simulada, y sobrevivieron, mientras que los infectados con el mutante SeV/mSf no lo hicieron y la mitad de los ratones murió. Por tanto, el SeV/mSf era claramente más virulento que el virus de tipo salvaje. La diferencia en virulencia fue cuantificada por la dosis letal del 50% (DL_{50}); la DL_{50} fue de $1,78 \times 10^6$ ufp para el virus de tipo salvaje y de $7,94 \times 10^4$ ufp para el mutante (Tabla 1). El virus mutante era por tanto 22 veces más virulento que el virus de tipo salvaje para la cepa BALB/c.

TABLA 1

DL₅₀ del virus del tipo salvaje y del virus mutante en ratones normales y desnudos

Inoculación	BALB/c	DL ₅₀	BALB/c (nu/nu)	DL ₅₀
Tipo salvaje	10^8	5/5 ^a	NT	
	10^7	5/5	3/5	
	10^6	1/4	$1,78 \times 10^6$	$3,16 \times 10^6$
	10^5	0/5	NT	
	10^4	0/5	0/5	
SeV/mSf	10^8	5/5	NT	
	10^7	5/5	5/5	
	10^6	5/5	$7,94 \times 10^4$	
	10^5	3/5	3/5	$7,94 \times 10^4$
	10^4	0/5	0/5	
^a Individuos muertos/individuos inoculados				

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) modulan la patogénesis del SeV de dos formas diferentes. Contribuyen a la eliminación o aclaramiento del virus del organismo por una parte y por otra aceleran la progresión de la enfermedad por procesos inmunopatológicos. Esto es, los resultados experimentales en los ratones BALB/c indican la posibilidad de una exacerbación indirecta debida a una respuesta inmune incrementada inducida por el SeV mutante, más que la posibilidad de efectos directos resultantes de una elevada reproducibilidad del SeV mutante en el organismo del ratón. Por tanto, en un intento de negar la posibilidad de una patogenicidad agravada resultante de una inmunidad inducida, se compararon las patogenicidades del virus de tipo salvaje y del virus mutante en ratones desnudos con un timo deficiente (Fig. 11). Los valores de la DL_{50} de cada virus fueron comparables para los ratones desnudos y para los ratones normales parentales, y se encontró una diferencia similar (hasta 40 veces) entre los dos virus para los ratones desnudos (Tabla 1). Estos resultados sugerían que los CTL no desempeñaban una función importante en la patogénesis de los virus de tipo salvaje y mutantes durante el periodo de observación (14 días) al menos sobre la base de las DL_{50} . Sin embargo, el virus de tipo salvaje y el virus mutante persistían ambos en los pulmones de los ratones desnudos a lo largo de todo el estudio, mientras que fueron eliminados en los ratones parentales (Fig. 12). Estos resultados sugieren que los CTL y otras respuestas dependientes del timo desempeñan al menos funciones parciales en la patología del virus. De los resultados anteriormente descritos, se deduce que la secuencia S natural del gen F suprime parcialmente la replicación del SeV de manera que permite que los ratones infectados sobrevivan durante más tiempo.

55 Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona vectores víricos de Paramyxoviridae cuyas secuencias S han sido modificadas. En los vectores víricos de esta invención, las secuencias S han sido modificadas de tal manera que se han modificado los niveles de transcripción de genes del genoma, en comparación con el virus de tipo salvaje. Estos virus son útiles para elevar la capacidad de proliferación del virus y la expresión de un gen foráneo deseado. Tales vectores víricos son ventajosos para mejorar la eficacia de producción de productos génicos. En contraste, en el caso de proteínas cuya expresión demasiado elevada es indeseable, es posible suprimir los niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas ligando los genes a la parte corriente abajo de la secuencia S con actividad de reinicio reducida, tal como la secuencia S del gen F. Además, cuando partículas víricas recombinantes o partículas similares a virus son recuperadas como composiciones farmacéuticas o vacunas, los virus que tienen un genoma en el que se ha modificado la secuencia S para elevar la capacidad de proliferación, son ventajosos en cuanto a que son capaces de producir una gran cantidad de virus en un corto tiempo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus Paramyxoviridae, en el cual la secuencia de inicio de la transcripción 3'-UCCCUAUUU-5' de al menos un gen ha sido sustituida por una secuencia seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' o 3'-UCCACUUA-5'.
- 10 2. Un virus Paramyxoviridae, en el que al menos una secuencia de inicio de la transcripción que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' y 3'-UCCACUUA-5' ha sido sustituida por 3'-UCCCUAUUU-5'.
- 15 3. El virus de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicho virus es deficiente en al menos el gen F, M o HN.
4. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho virus tiene un gen foráneo.
5. Un ADN que codifica el genoma del virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un método para incrementar el nivel de expresión de un gen incluido en un virus Paramyxoviridae que tiene la secuencia de inicio de la transcripción 3'-UCCCUAUUU-5', método que comprende la sustitución de dicha secuencia por una secuencia seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' y 3'-UCCACUUA-5'.
- 25 7. Un método para disminuir el nivel de expresión de un gen incluido en un virus Paramyxoviridae que tiene la secuencia de inicio de la transcripción seleccionada del grupo que consta de 3'-UCCACUUU-5', 3'-UCCAGUUU-5' y 3'-UCCACUUA-5', método que comprende la sustitución de dicha secuencia por 3'-UCCCUAUUU-5'.
8. Un virus Paramyxoviridae que tiene un gen foráneo, donde dicho gen foráneo tiene la secuencia de inicio de la transcripción 3'-UCCCUAUUU-5'.
- 30 9. El virus de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho virus es deficiente en al menos el gen F, M o HN.
10. Un ADN que codifica el genoma del virus de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

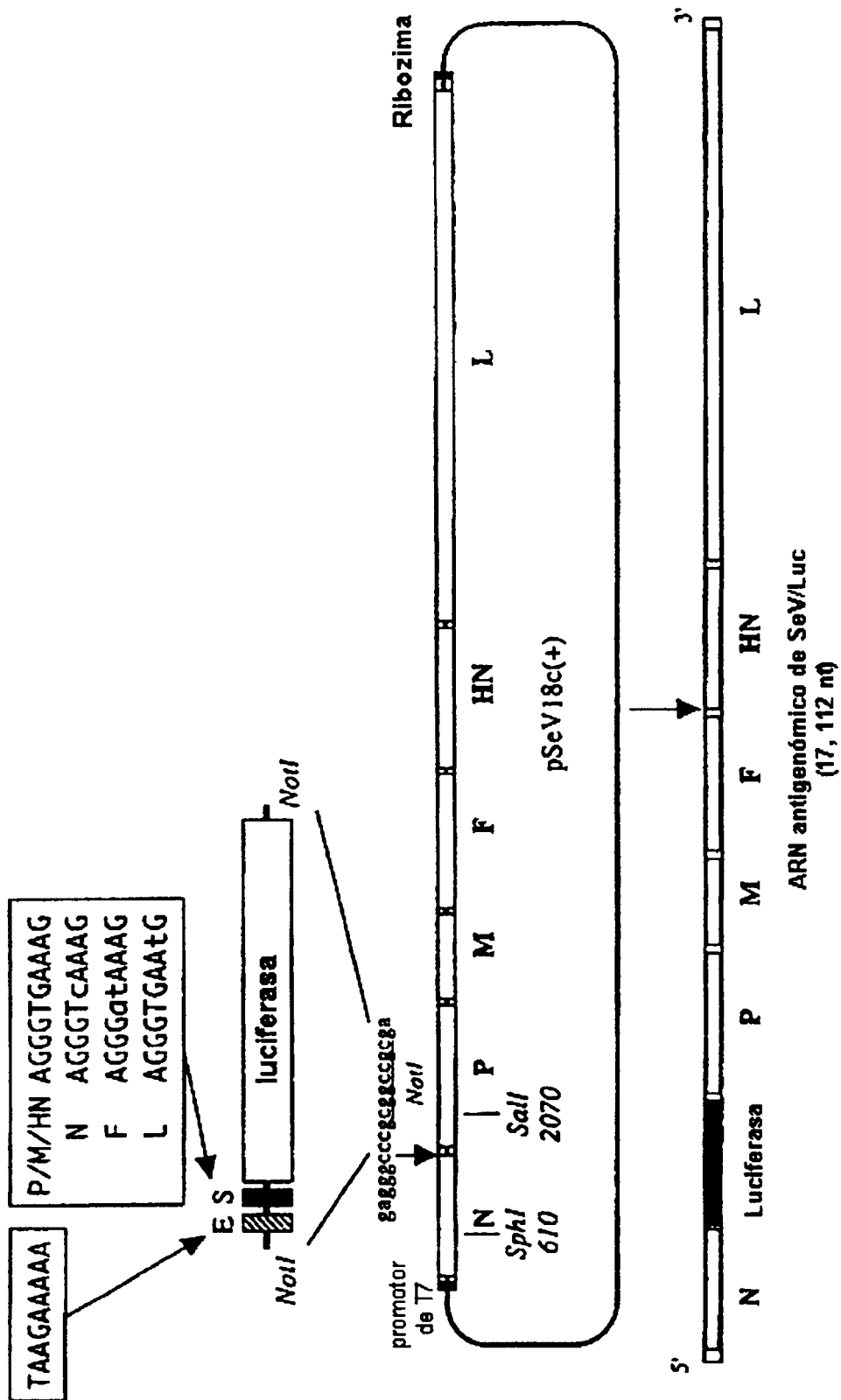


Figura 3

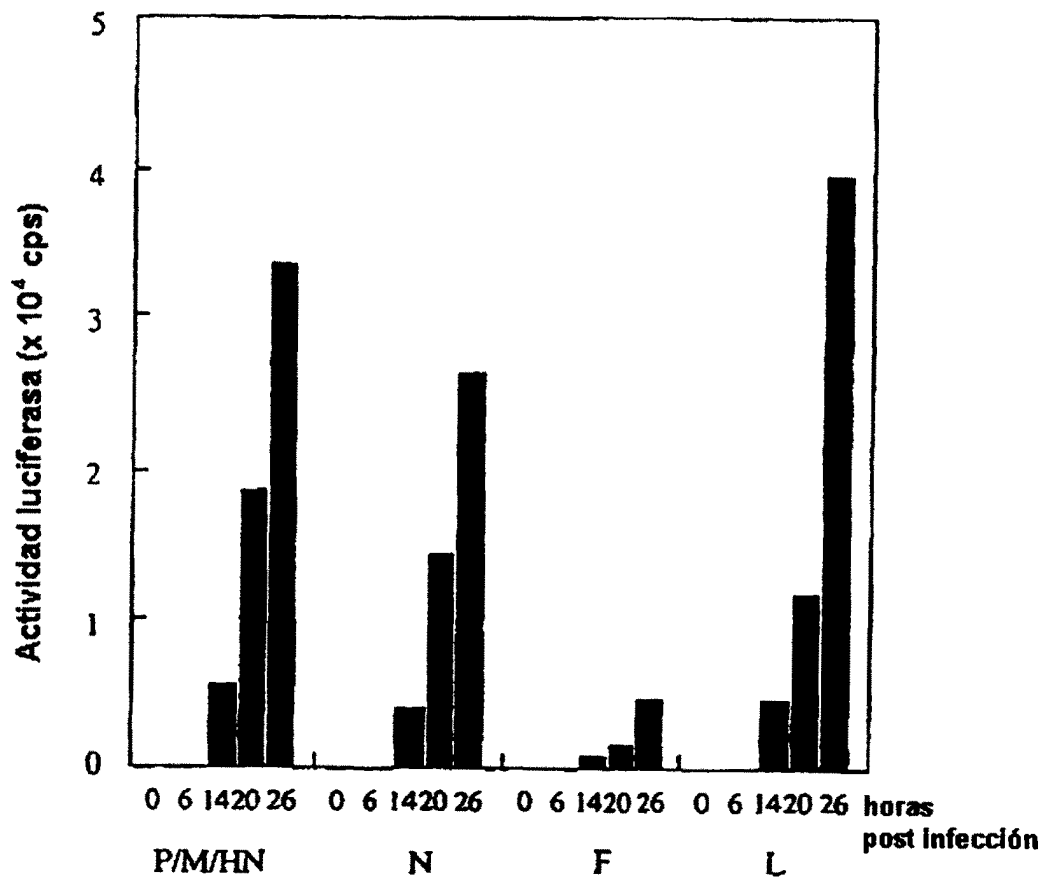


Figura 4

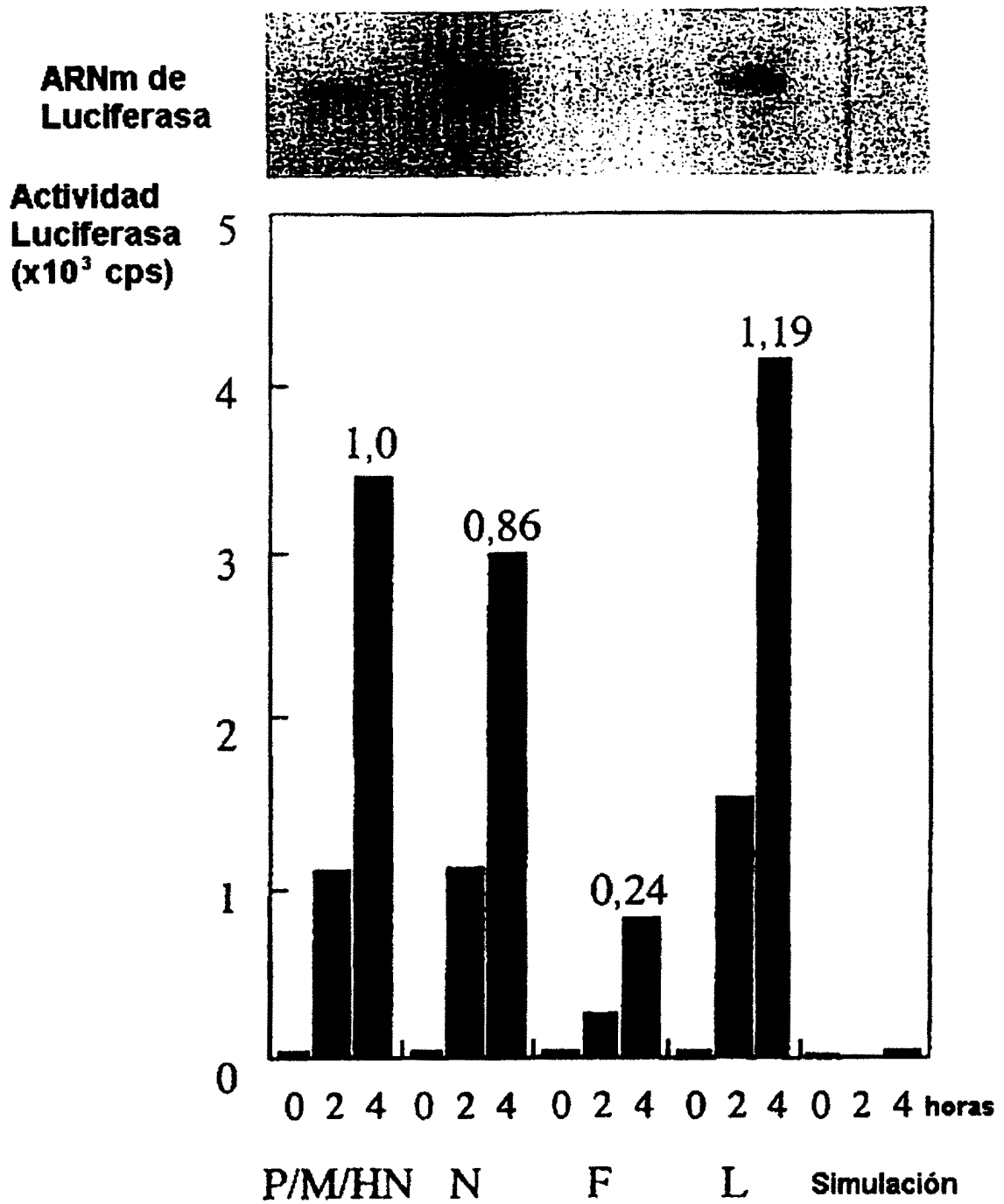


Figura 5

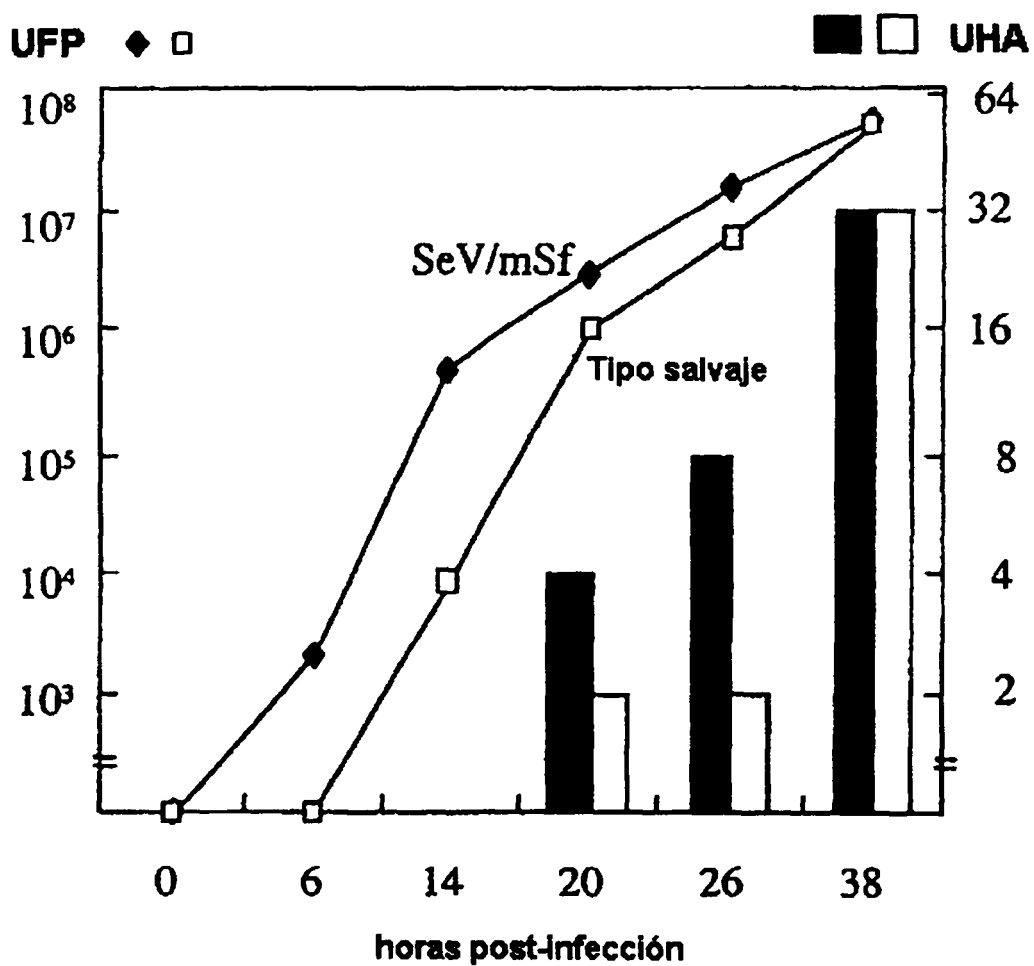


Figura 6

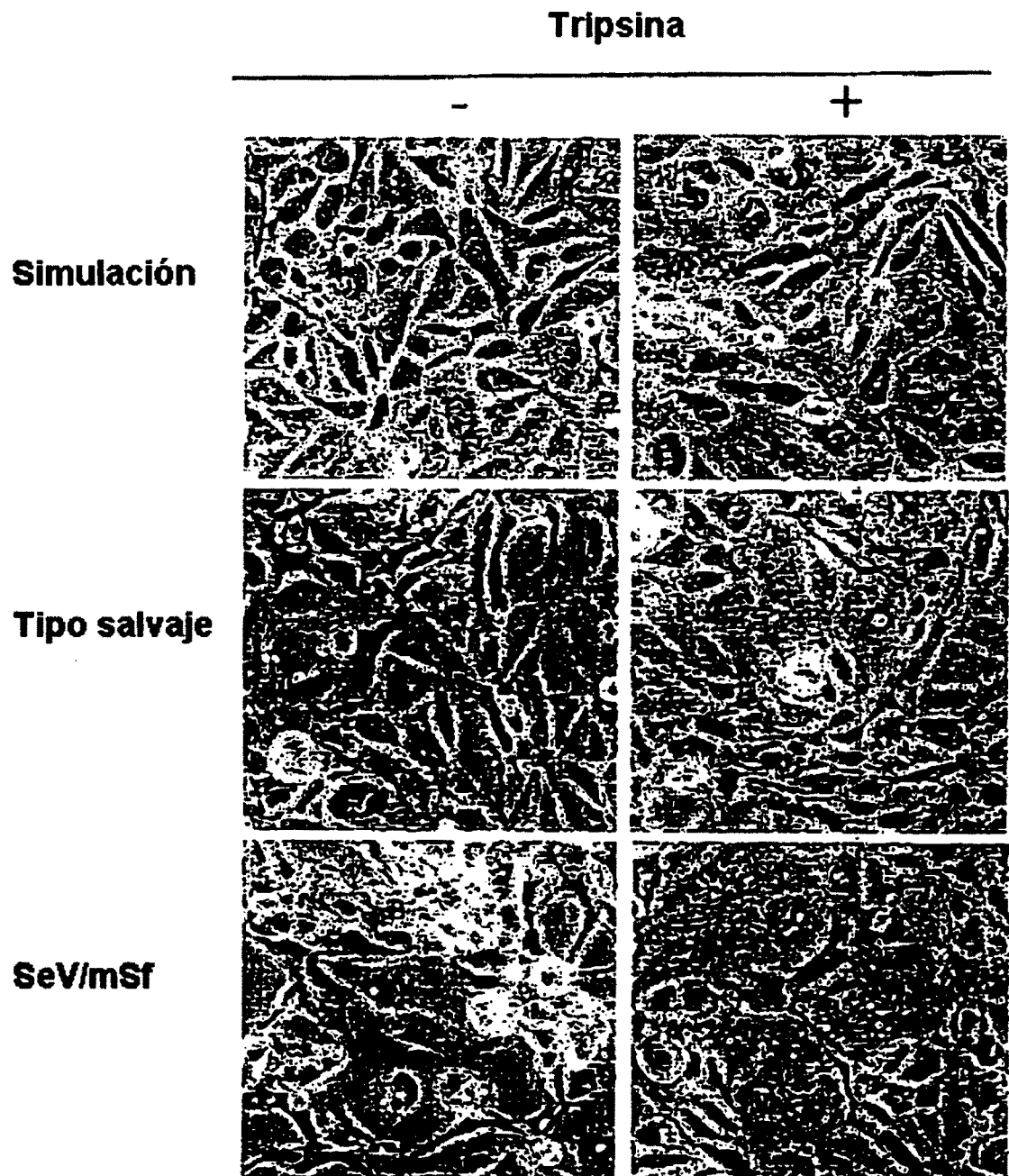


Figura 7

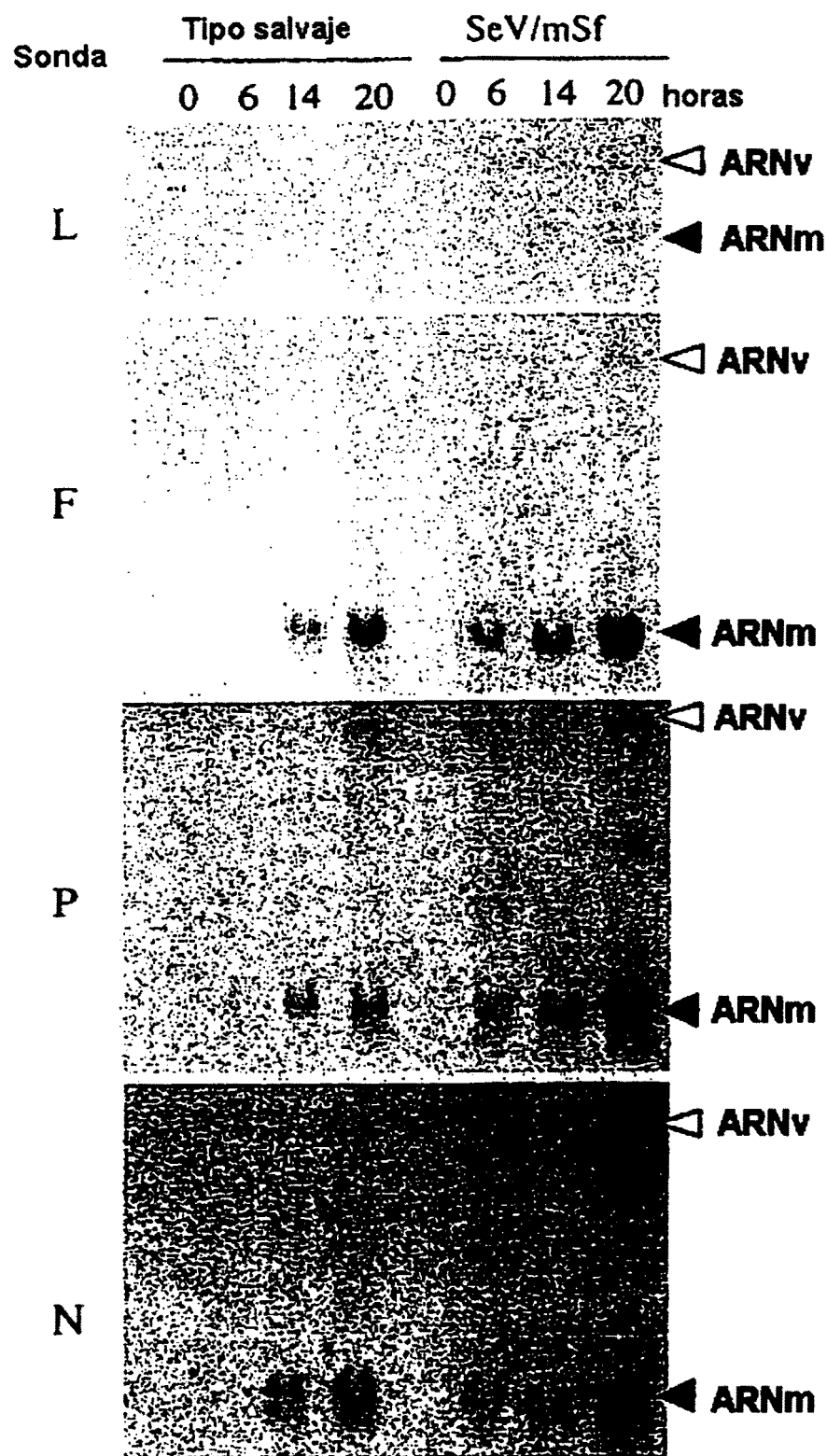


Figura 8

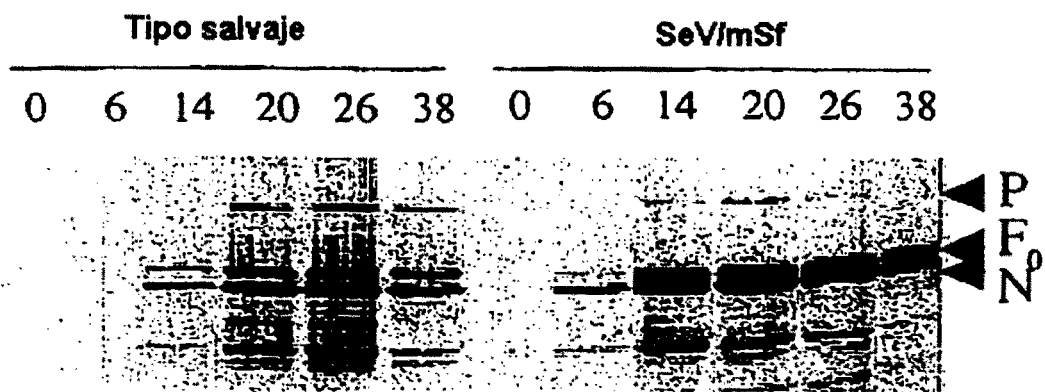


Figura 9

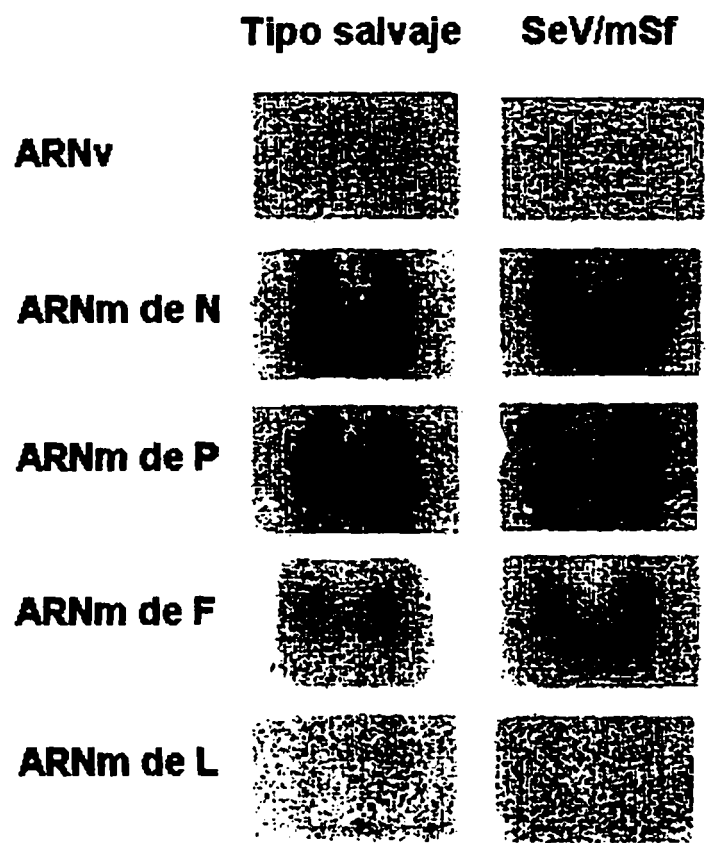


Figura 10

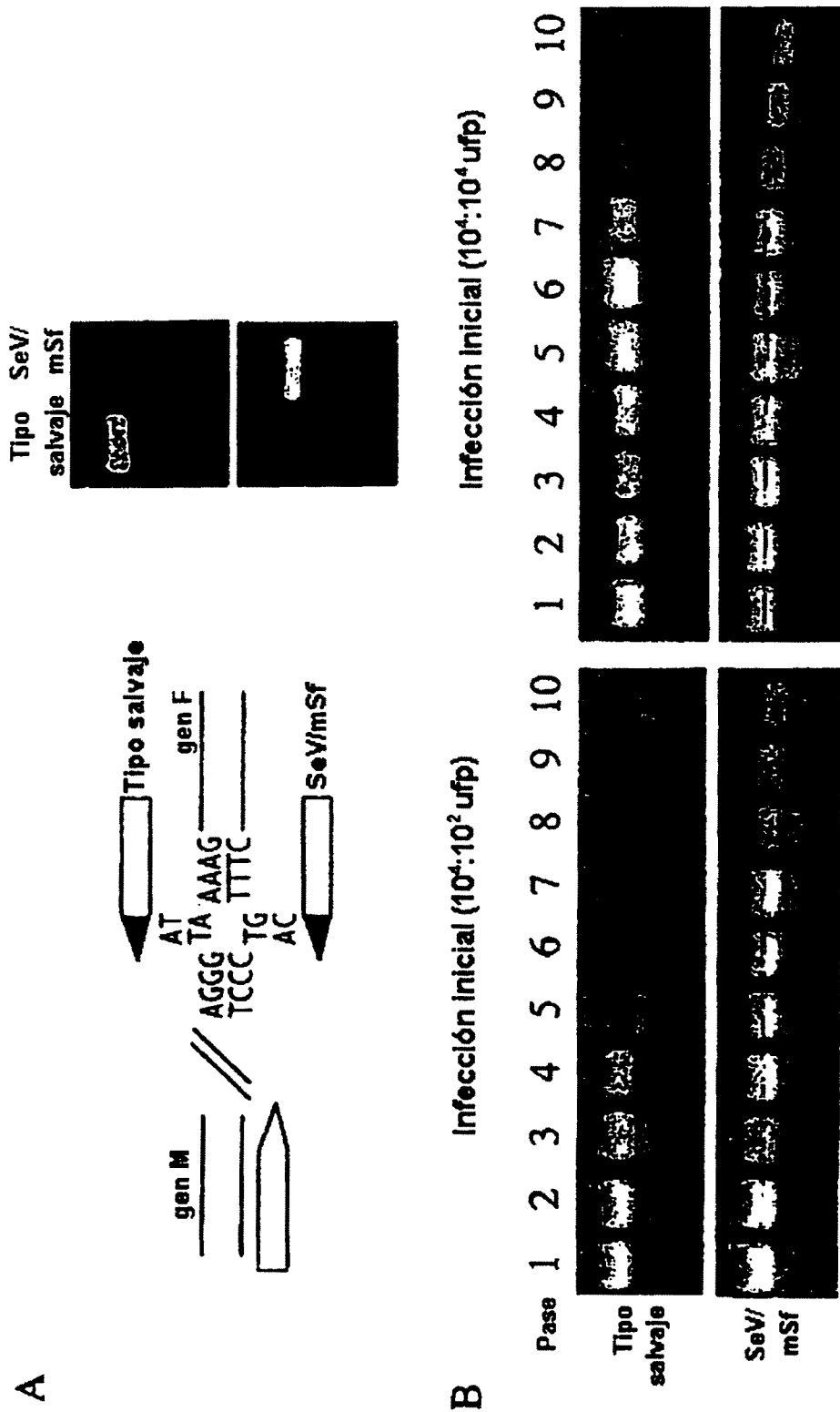


Figura 11

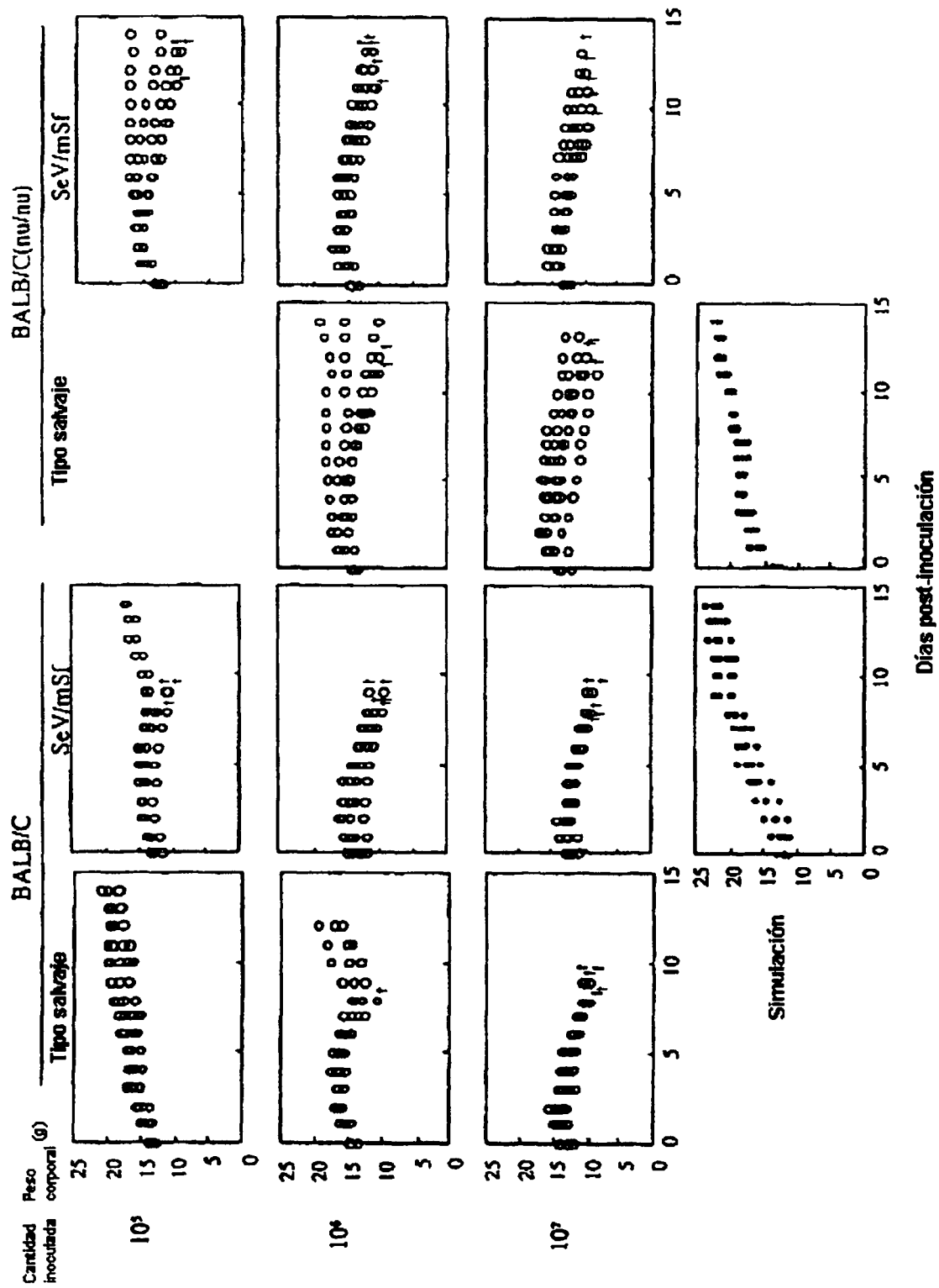
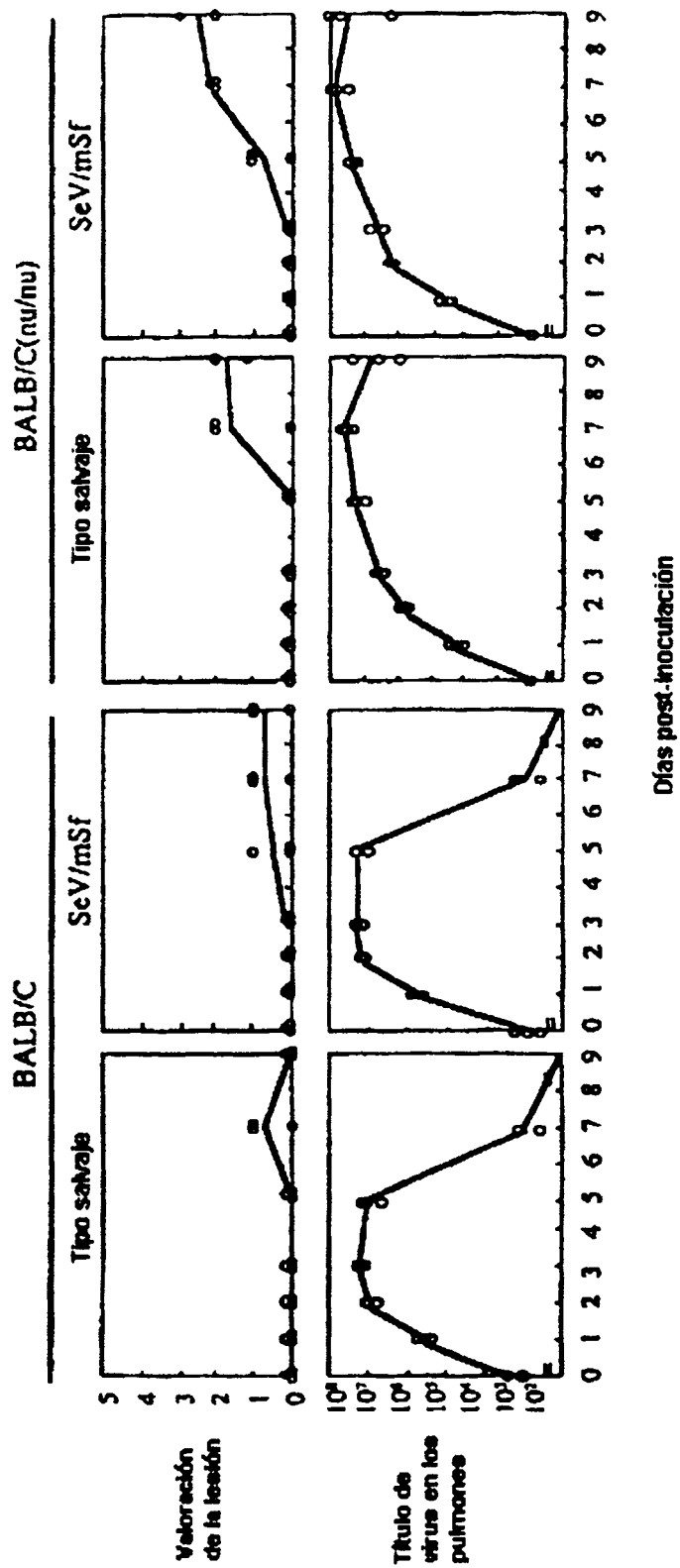


Figura 12



ES 2 288 866 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> DनावेC Research Inc	
5	<120> Paramixovirus con señales de inicio de la transcripción alternativas	
	<130> D3-007PCT	
	<140>	
	<141>	
10	<150> JP 1999-252231	
	<151> 06-09-1999	
	<160> 17	
15	<170> PatentIn Ver. 2.0	
	<210> 1	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente	
25	<400> 1	
	gagggcccgccg ggccgcga	18
30	<210> 2	
	<211> 38	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	
40	<400> 2	
	gagggcccgccg ggccgcgata cgaggcttca aggtactt	38
45	<210> 3	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	
55	<400> 3	
	tcgaggcccgccg gggccctctg atcctagatt cctcctac	38
60	<210> 4	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	

ES 2 288 866 T3

<400> 4

caaagtatcc accaccctga ggagcagggt ccagaccctt tgctttgc

48

5

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente

15 <400> 5

ttaagttggt vagtgactc

19

20 <210> 6

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente

30 <400> 6

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttaggggtga aagttcactt cacgatggaa gacggcaaaa 60

acat

64

35

<210> 7

<211> 64

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente

45 <400> 7

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttaggggtca aagttcactt cacgatggaa gacggcaaaa 60

acat

64

50

<210> 8

<211> 64

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente

60 <400> 8

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttaggggata aagttcactt cacgatggaa gacggcaaaa 60

acat

64

65

<210> 9

ES 2 288 866 T3

	<400> 13	
	taccatagg tgtggccaaa t	21
5	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	
15	<400> 14	
	taatagcact cactataggg c	21
20	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	
30	<400> 15	
	ttttctact tgggtaatc	20
35	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	
45	<400> 16	
	gcactcacia gggacttca	20
50	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de un cebador sintetizada artificialmente	
60	<400> 17	
	gcactcacia gggactttat	20
65		