



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 651**

51 Int. Cl.:
C07K 14/115 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06706871 .8**
96 Fecha de presentación : **10.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1851239**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Virus de ARN de replicación deficiente como vacunas.**

30 Prioridad: **11.02.2005 DE 10 2005 006 388**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2009

73 Titular/es: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e.V.
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE**

72 Inventor/es: **Neubert, Wolfgang, J.;
Bossow, Sascha y
Schlecht, Sabine**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Virus de ARN de replicación deficiente como vacunas.

5 La presente invención se relaciona con un virus de ARN de cadena negativa de replicación deficiente y competente para la transcripción, que puede utilizarse para la expresión de transgénicos y particularmente para el ámbito del desarrollo de vacunas.

10 Las inmunizaciones con vacunas vivientes imitan la infección natural y producen una amplia respuesta inmunológica. En la vacunación se emplean virus atenuados, pero capaces de propagarse. La amplificación de los virus de vacunación tiene que realizarse tan lentamente que se garantice una respuesta inmunológica y, por tanto, un control de la amplificación y/o una eliminación del virus. El concepto de la vacuna viviente ha resultado a menudo satisfactorio para diferentes grupos de edad. Evidentemente hay importantes grupos objetivo, en los que las inmunizaciones con vacunas vivientes son problemáticas y requieren medidas adicionales de seguridad. Los anticuerpos maternos protegen a los bebés en los primeros meses de vida. Representan, al mismo tiempo, una barrera, que tiene que sobrepasarse con la inmunización viviente, sin que pueda producirse además, por otro lado, una amplificación excesiva del virus de vacunación y, por tanto, unos daños de vacunación asociados. Otro grupo objetivo lo representan las personas mayores, cuyo sistema inmunológico no es ya tan eficiente, de forma que puede producirse una sobrecarga por la vacunación y daños de vacunación por la amplificación elevada del virus de vacunación. Surge, por consiguiente, el problema de hacer a la vacuna viviente inmunológicamente excelente aún más segura para el empleo en determinados grupos objetivo, pero también elevar el perfil de seguridad para el empleo general.

25 Los virus de ARN de cadena negativa, como por ejemplo, el virus de la rabia o el virus Sendai (SeV), se pueden modificar desde hace algunos años a propósito mediante técnica genética inversa. La EP-A-0 702 085 describe la elaboración de virus de ARN de cadena negativa recombinante, infeccioso, replicante y no segmentado a partir de ADN clonado. La EP-A-0 863 202 describe un virus Sendai recombinante, en cuyo genoma se inserta un gen heterólogo o se suprime o desactiva un gen, cuya replicación del genoma está, sin embargo, aún intacta.

30 Como elemento vertebral de la vacuna sirven especialmente los virus de ARN de cadena negativa, ya que su amplificación en el citoplasma discurre a nivel de ARN y los genes dentro del genoma viral pueden sustituirse simplemente. Así, ha resultado ya exitoso, preparar virus recombinantes con proteínas superficiales de diferentes tipos de virus y emplearlos como vacuna en ensayos con animales (Schmidt *et al.*, J. Virol. 75 (2001), 4594-4603 y WO 01/42445). Mediante la incorporación recombinante de proteínas F y HN del virus parainfluenza humano tipo 3 (HPIV 3) y de la proteína G o F del virus sincitial respiratorio (RSV) en un vector a base del virus parainfluenza bovino tipo 3 (BPIV 3) pudo comprobarse, tras la aplicación en hamsters, una respuesta inmunológica mucosal contra HPIV 3 y RSV. Se alcanza ya, por tanto, antigenidad bivalente de estas vacunas vivientes examinadas en el ensayo con animales.

40 Debido a la participación de la barrera de especies, este virus parainfluenza bovino debería atenuarse suficientemente con antígenos superficiales PIV 3 y RSV humanos ya para un empleo en el ámbito humano. No son de esperar reversiones al tipo salvaje, ya que se sustituyen genes completos por proteínas superficiales virales. Se ha comenzado ya con el examen clínico de la vacuna.

45 Como los mutantes víricos descritos son, no obstante, competentes en la replicación, se producirá seguramente una propagación del virus en la vacuna, cuya intensidad se atenúe modificando el virus, pero no se elimine completamente. La fuerza de la viremia a esperar y, por tanto, la carga de la vacuna con efectos secundarios dependen además de factores individuales.

En el contexto de la presente invención debería intentarse reducir sustancialmente los riesgos de la vacunación viviente, particularmente el riesgo de vacunas de determinados grupos objetivo.

50 Un principio para esto consiste en la supresión de la replicación del genoma viral tras la aplicación de la vacuna. De este modo no puede provocarse, independientemente de la eficiencia inmunológica de la vacuna, una amplificación del virus y los daños de vacunación apropiados.

55 La dificultad principal en este principio consiste en que la ARN polimerasa viral efectúa dos funciones, la síntesis de ARNm viral y la amplificación del genoma viral. Este doblete tiene que suprimirse en la nueva vacuna, ya que la vacuna sólo puede ser capaz aún de la síntesis de ARNm viral.

60 Otro problema consiste en que el virus recombinante tiene que originar una síntesis eficiente de ARNm viral, para ser generalmente apropiado como vacuna viviente. Existen, por tanto, dos requisitos en principio contradictorios, que pueden sugerir considerables dificultades durante la elaboración de vacunas vivientes a base de virus de ARN de cadena negativa seguras, pero eficientes.

65 Shoji *et al.* (Virología 318 (2004), 295-305) describen la elaboración y caracterización de un virus de la rabia deficiente en el gen P. La producción del virus se lleva a cabo por medio de células colaboradoras productoras de proteína P. Los virus sólo son capaces de la transcripción primaria sin síntesis de novo de proteína P. La baja expresión génica viral se muestra en una señal muy débil para la proteína N en la inmunofluorescencia y sólo para muy pocas células, una comprobación convincente de esta baja expresión génica viral se efectúa sólo mediante análisis PCR.

El empleo de este mutante del virus en un test de reacción en el modelo de ratón debería mostrar una protección, evidentemente falta un experimento de control con virus inactivo para la transcripción y el intervalo para la reacción viral se ha calculado demasiado corto. No se estudia la duración de la protección supuesta. El empleo de estos mutantes del virus para el desarrollo de una vacuna antirábica atenuante parece, por tanto, poco prometedor.

En el contexto de las investigaciones que conducen a la presente invención se ha descubierto que en los paramyxovirus puede lograrse un desacoplamiento de las funciones de replicación y transcripción, eliminando parcialmente los componentes de la polimerasa esenciales para la función de replicación del genoma. Es sich aquí puede tratarse de la proteína P viral o de un dominio funcional especial de una proteína de este tipo.

Se ha descubierto sorprendentemente, que mediante las mutaciones, en las que la función de las proteínas codificadas por el gen P viral no se suprime razonable, sino parcialmente, pueden producirse virus de ARN de replicación deficiente, que tengan una función de transcripción suficiente para ser apropiados para la producción de vacunas vivientes.

Un objeto de la presente invención es por tanto, un virus de ARN de cadena negativa recombinante, que sea de replicación deficiente y competente en la transcripción. El virus conforme a la invención contiene un genoma viral con una mutación en el gen P, conllevando la mutación a la pérdida de la replicación del genoma sin pérdida de la capacidad de transcripción secundaria.

El virus conforme a la invención es una condición para la producción de vacunas vivientes, particularmente para la producción de vacunas vivientes con un elevado perfil de seguridad, que sean especialmente apropiadas para el empleo en pacientes de riesgo con un sistema inmunológico débil o dañado.

La presente invención hace también referencia a un nucleocápside del virus recombinante, comprendiendo el ARN viral de cadena negativa, complejo con las proteínas N, L y P, así como el ARN de cadena negativa del virus recombinante en forma aislada.

Otro objeto de la invención es un ADNc, que codifique un ARN de cadena negativa conforme a la invención, particularmente un ARN viral o/y un ARN complementario a éste.

Otro objeto más de la invención es una línea celular para la amplificación del virus de ARN de cadena negativa recombinante conforme a la invención.

El virus de ARN de cadena negativa recombinante conforme a la invención puede obtenerse mediante mutación de un virus inicial en el gen P. el virus de partida puede ser un virus natural de ARN de cadena negativa, particularmente de las familias *Paramyxoviridae* o *Rhabdoviridae* o variantes recombinantes de estos. Son representantes especialmente preferentes los paramyxovirus, por ejemplo, virus Sendai, virus parainfluenza humano o bovino, por ejemplo, virus parainfluenza humano (hPIV) tipo 1, 2, 3, 4a o 4b, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas, virus del sarampión o virus sincitial respiratorio humano (hRSV) o Rhabdo-virus, por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular (VSV). El virus es, de manera especialmente preferente, un virus Sendai, por ejemplo, de la variedad Fushimi (ATCC VR105). La invención abarca también a las variantes recombinantes de los virus citados anteriormente, tal y como se describen, por ejemplo, en la EP-A 702 085, EP-A-0 863 202 o WO 01/42445.

Otros virus de ARN de cadena negativa preferentes son los representantes de las *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Bomaviridae*, *Arenaviridae* o *Bunyaviridae*, por ejemplo, VSV.

El virus Sendai es - del mismo modo que otros paramyxovirus - un virus encapsulado con nucleocápside helicoidal (Figura 1). La envoltura consiste en una membrana lipídica, que procede de la membrana plasmática de la célula huésped, de la que se liberó el virus. En la envoltura viral se anclan glicoproteínas transmembranarias, o sea, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuramidasa (HN). La proteína matricial (M) reviste la cara interna de la membrana. El nucleocápside contenido en la envoltura consiste en ARN monocatenario en complejo con proteína nuclear (N), ligando una proteína N, en cada caso, 6 nucleótidos del ARN, una ARN polimerasa dependiente del ARN (L) y el co-factor fosfoproteína (P).

El genoma de ARN de cadena negativa del virus Sendai contiene los genes de las 6 proteínas estructurales en la secuencia: 3'-N-P/C-M-F-HN-L-5' (Figura 2). El gen P/C codifica en conjunto 8 proteínas, la fosfoproteína estructural y todas las proteínas no-estructurales conocidas hasta ahora.

Las proteínas P, N y L son importantes para una transcripción y replicación funcionales (Lamb *et al.*, Paramyxoviridae: Los Virus y su Replicación. Fields Virology, 4ª Ed. (2001), Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1305-1340).

El virus de ARN de cadena negativa recombinante conforme a la invención contiene una mutación en el gen P. La mutación puede ser una supresión, sustitución o/y inserción en el gen P, que produzca una deficiencia en la replicación del virus, pero que no destruya la capacidad para la transcripción. La mutación se relaciona preferentemente con una secuencia parcial de las proteínas codificadas por el gen P, necesaria para la replicación, mientras que otras secuencias parciales necesarias para la transcripción se mantienen funcionales.

En la presente invención, el virus recombinante presenta una mutación en el gen P, es decir, en una secuencia parcial N-terminal del gen P. La mutación se relaciona preferentemente al menos con el rango de los aminoácidos 33-41 de la proteína P, que son importantes para la replicabilidad. Se prefiere además, que el rango C-terminal (a partir del aminoácido 320) no tenga ninguna mutación que perjudique a la función de transcripción. La mutación es, de manera especialmente preferente, una mutación en el rango de los aminoácidos 2-77 que origine la pérdida de la replicabilidad, por ejemplo, una supresión de (a) los aminoácidos 2-77 de la proteína codificada por el gen P o (b) una secuencia parcial de (a) suficiente para la pérdida de la replicabilidad. Las mutaciones apropiadas pueden realizarse también en proteínas P de otro virus de ARN de cadena negativa, por ejemplo, de otro paramyxovirus, por ejemplo, hPIV3.

El virus recombinante conforme a la invención es deficiente en la replicación y competente en la transcripción. La pérdida de la replicabilidad significa que, en una célula objetivo (una célula, que no proporcione ninguna de las funciones *en trans* suprimidas por mutación), no hay ninguna amplificación comprobable del genoma vírico, no existiendo, en contraste con una deficiencia reducida y/o condicional en la replicación, tampoco ninguna condición permisiva, en la que pueda verificarse una replicación. La determinación de la pérdida de la replicabilidad puede realizarse tal y como se describe en el Ejemplo 8. El virus conforme a la invención es, sin embargo, capaz de transcribir, tras la infección en una célula objetivo, los productos génicos codificados por él, de forma que pueda realizarse en la célula objetivo una expresión de las proteínas virales incluyendo uno o varios productos génicos heterólogos. Es importante, que el virus recombinante conforme a la invención tenga la capacidad para la transcripción secundaria, es decir, los productos génicos virales, originados por transcripción primaria con los componentes proteicos contenidos inicialmente en el nucleocápside, son capaces de originar o/y apoyar incluso una transcripción secundaria. La extensión de la transcripción secundaria conlleva, por tanto, una síntesis de proteínas de preferentemente al menos un 1%, al menos un 2%, al menos un 3%, al menos un 4% o al menos un 5% frente a un virus de tipo salvaje apropiado, es decir, un virus sin la mutación en el gen P. La capacidad para la transcripción secundaria puede ser reducida frente al virus de tipo salvaje apropiado, aunque preferentemente, a lo sumo, en torno al factor 20, de manera especialmente preferente, a lo sumo, en torno al factor 10. La capacidad para la transcripción secundaria puede determinarse como en el Ejemplo 7.1 o/y 7.3 mediante determinación cuantitativa de la expresión de un producto génico heterólogo, por ejemplo, de una proteína reportera.

El virus recombinante conforme a la invención contiene, junto a la mutación, preferentemente al menos un transgénico, es decir, al menos una secuencia codificadora de un producto génico heterólogo. El producto génico heterólogo puede ser una proteína, por ejemplo, una proteína reportera, por ejemplo, una proteína de fluorescencia, como por ejemplo, GFP o un derivado de ésta, o un antígeno, contra el que debería producirse una respuesta inmunológica, o una proteína terapéutica, por ejemplo, una proteína para la viroterapia o también una molécula funcional de ARN, por ejemplo, un ARN antisentido, una ribozima o una molécula de ARNsi apta para la interferencia del ARN. El producto génico heterólogo es preferentemente un antígeno, procedente de un patógeno, como por ejemplo, un virus, una bacteria, un hongo o un protozoo, un antígeno tumoral o un autoantígeno. El antígeno es, de manera especialmente preferente, un antígeno viral, procedente de un virus heterólogo de ARN de cadena negativa, como por ejemplo, un virus parainfluenza humano o RSV, por ejemplo, hPIV3 F y HN y/o hRSV F y G. El virus conforme a la invención puede contener una o varias, por ejemplo, dos o tres, secuencias codificadoras de un producto génico heterólogo.

En el genoma del virus recombinante pueden insertarse secuencias codificadoras de productos génicos heterólogos. Por otro lado, las secuencias codificadoras de productos génicos homólogos, por ejemplo, los genes F o/y HN, pueden sustituirse también por secuencias, que codifiquen productos génicos heterólogos, por ejemplo, productos génicos quiméricos. También son posibles las combinaciones de transgénicos insertados y sustituidos.

Así pueden sustituirse total o parcialmente, por ejemplo, secuencias de un virus Sendai por secuencias heterólogas de otro virus de ARN de cadena negativa, por ejemplo, por secuencias de virus parainfluenza, por ejemplo, hPIV3, o/y por secuencias de RSV. Se emplean secuencias quiméricas de manera especialmente preferente, es decir, secuencias constituidas por secciones del genoma vírico de base y secciones de un genoma vírico heterólogo. Por ejemplo, pueden utilizarse genes F o/y HN quiméricos en el genoma vírico, compuestos por secuencias del genoma vírico de base, por ejemplo, virus Sendai y secuencias heterólogas, por ejemplo, de virus parainfluenza humanos, como por ejemplo, hPIV3, o/y RSV.

El virus recombinante puede contener uno o varios transgénicos diferentes. Cuando haya varios transgénicos, estos podrán ser del mismo o distinto origen, que puede proceder, por ejemplo, de un único o de varios patógenos, por ejemplo, virus, diferentes. Así puede haber transgénicos formados por varios, por ejemplo, 2 ó 3 patógenos diferentes, preferentemente virus, de manera especialmente preferente virus de ARN de cadena negativa.

La incorporación de transgénicos a paramyxovirus se describe, por ejemplo, en Hasan *et al.* (J. Gen. Virol. 78 (1997), 2813-2820), Bukreyev *et al.*, (J. Virol. 70 (1996), 6634-6641), Yu *et al.* (Gene Cells 2 (1997), 457-466), Masaki *et al.* (FASEBVB J. 15 (2001), 1294-1296), Shiotani *et al.* (Gene Therapy 8 (2001), 1043-1050) y Bitzer *et al.* (Mol. Therapy 7 (2003), 210-217). Los transgénicos se insertan preferentemente en la zona 3'- del genoma viral. La inserción se lleva a cabo, por ejemplo, en forma de casetes de transcripción, introduciéndose en el plano del vector (es decir, sobre el plano del vector, por ejemplo, de un vector de plásmidos, que codifica el ARN de cadena negativa), directamente después de la zona líder, uno o varios casetes de transcripción con interfaces singulares de restricción para la integración del respectivo marco de lectura. Una integración de varios transgénicos se lleva a cabo preferentemente en casetes de transcripción independientes en cada caso. Un casete de transcripción contiene

preferentemente la secuencia codificadora del producto génico heterólogo en enlace operativo con una secuencia de inicio de la transcripción y una secuencia de conclusión de la transcripción y preferentemente señales de traducción.

Otro objeto de la presente invención es una molécula monocatenaria o bicatenaria de ADN, por ejemplo, una molécula de ADNc, que codifique un genoma vírico de ARN de cadena negativa recombinante conforme a la invención o una etapa previa de éste o el antigenoma vírico o una etapa previa del mismo. El término “etapa previa” significa, en este contexto, que la molécula de ADN no contiene aún ninguna secuencia codificadora de un producto génico heterólogo, sino únicamente una posición de clonación para la inserción de tal secuencia. La posición de clonación puede ser una interfaz de restricción, por ejemplo, una interfaz de restricción singular o no-singular en el ADN o una posición de clonación múltiple, conteniendo varias interfaces de restricción consecutivas, preferentemente interfaces de restricción singulares. La molécula de ADN codificadora del genoma vírico o/y la secuencia complementaria se encuentra preferentemente en enlace operativo con secuencias apropiadas de control de la expresión.

La molécula de ADN es preferentemente un vector, por ejemplo, un vector de plásmidos, apropiado para la propagación en una célula huésped apropiada, es decir, en una célula de amplificación de vectores o plásmidos, preferentemente en una célula procariótica, pero también en una célula eucariótica, particularmente en una célula mamaria, y que presenta los elementos genéticos necesarios para ello, como por ejemplo, fuente de replicación, secuencias de integración o/y secuencias de marcadores de selección.

La molécula de ADN contiene la secuencia codificadora del virus recombinante o la secuencia complementaria, preferentemente bajo control de una señal de transcripción, de forma que, durante la transcripción con una ARN polimerasa dependiente del ADN en una célula huésped apropiada para la elaboración inicial del virus, es decir, en una célula de producción de virus, pueda formarse el ARN viral de cadena negativa. La señal de transcripción se selecciona de forma que posibilite una transcripción eficiente del ADN en la célula huésped empleada en cada caso. Para esto puede emplearse también una señal de transcripción heteróloga para la respectiva célula, por ejemplo, un promotor de bacteriófago, como por ejemplo, el promotor T7 o SP6, teniendo que contener la célula de producción de virus entonces también una ARN polimerasa dependiente del ADN heteróloga apropiada, por ejemplo, la ARN polimerasa T7 o SP6, que produzca la transcripción. La molécula de ADN contiene además, junto a la señal de transcripción, preferentemente en el extremo 3'- de la secuencia codificadora del virus recombinante, un terminador de la transcripción y una secuencia de ribozimas, que posibilite una división de la transcripción al final de la secuencia viral. La célula de producción de virus es preferentemente una célula eucariótica y particularmente una célula mamaria.

La célula de producción de virus conforme a la invención contiene, por otra parte, junto al ADN codificador del paramyxovirus de replicación deficiente, secuencias colaboradoras, cuyos productos génicos posibiliten un ensamblaje *en trans* del ARN de virus recombinante conforme a la invención. La célula puede contener además para ello, por ejemplo, uno o varios vectores, que dispongan de la proteína N, la proteína P o/y la proteína L *en trans*. De este modo se posibilita un ensamblaje de nucleocápsides del virus recombinante conforme a la invención en la célula productora.

La amplificación del virus recombinante ensamblado inicialmente en la célula de producción de virus se lleva a cabo en una célula de amplificación de virus, infectada con el virus conforme a la invención. La célula de amplificación de virus contiene adicionalmente secuencias colaboradoras como las citadas anteriormente, para el suministro de la proteína N, o/y de la proteína P *en trans*. Preferentemente se emplea una célula de amplificación de virus, en la que se lleva a cabo una expresión estable de las secuencias colaboradoras, por ejemplo, mediante integración genómica. La célula de amplificación de virus es preferentemente una célula mamaria. Una célula de amplificación especialmente preferente es la célula H29 derivada de una célula 293, de una línea celular de fibroblastos renales embrionarios humanos o una célula derivada de esta. La célula H29 se depositó el 05.11.2004 (DSM ACC2702) conforme a las determinaciones del Tratado de Budapest en la agrupación alemana para microorganismos y cultivos celulares GmbH, Braunschweig, vía Mascheroder. Resultan también apropiadas las células derivadas de células Vero, de una línea de células renales del cercopiteco verde africano, o de células LLCMK2, de una línea de células renales del mono resus, transfectadas de manera estable con secuencias colaboradoras apropiadas, por ejemplo, genes SeV N y P.

Otro objeto de la invención es por tanto, una célula, preferentemente una célula eucariótica y de manera especialmente preferente una célula mamaria, conteniendo (i) una molécula de ADN, que codifique el genoma del virus recombinante conforme a la invención o/y la secuencia complementaria del mismo o una etapa previa del mismo, o/y (ii) un genoma de ARN del virus conforme a la invención. La célula puede ser una célula de amplificación de vectores, una célula de producción de virus o una célula de amplificación de virus, tal y como se ha explicado anteriormente.

Cuando la célula sea una célula de amplificación de vectores, por ejemplo, una célula de amplificación de plásmidos, puede emplearse cualquier célula apropiada para la amplificación del vector apropiado, por ejemplo, también una célula procariótica, como por ejemplo, una célula de *E. coli* transformada.

Cuando la célula sea una célula de producción de virus o de amplificación, contendrá secuencias colaboradoras para la producción de las proteínas víricas N,P o/y L *en trans*. El ADN introducido en una célula de producción de virus se encuentra preferentemente bajo el control de una señal de transcripción heteróloga, conteniendo la célula favorablemente además un ADN, que codifica una ARN polimerasa heteróloga dependiente del ADN, que reconoce la señal de transcripción heteróloga y produce la transcripción del ADN codificador para el virus de ARN de cadena negativa recombinante.

Cuando la célula sea una célula de amplificación de virus, se infectará con una molécula de ARN viral genómica, por ejemplo, en forma de nucleocápside, y contendrá las secuencias colaboradoras en forma producible de manera estable.

Otro objeto más de la presente invención es un procedimiento para la producción de un virus de ARN de cadena negativa recombinante conforme a la invención, comprendiendo los pasos:

- (a) suministro de una célula de producción de virus, transfectada con una molécula de ADN, que codifique el genoma de un virus de ARN de cadena negativa, conteniendo una mutación en el gen P, que conlleve la pérdida de la replicabilidad del genoma sin pérdida de la capacidad de transcripción, y, si fuera necesario, al menos una secuencia codificadora de un producto génico heterólogo, y
- (b) cultivo de la célula huésped en unas condiciones, en las que se lleve a cabo una transcripción de la molécula de ADN conforme a (a) y se produzca el virus de ARN de cadena negativa recombinante.

La célula huésped es capaz preferentemente de proporcionar la proteína N, la proteína P y/o la proteína L *en trans*, por ejemplo, mediante transfección con los plásmidos colaboradores apropiados, que contengan secuencias codificadoras de las proteínas N, P o/y L.

Para la producción de mayores concentraciones de nucleocápsides y/o de partícula vírica se emplea preferentemente una célula, que, de manera estable, produzca constitutivamente o de manera inductible las proteínas N, + o/y P, preferentemente al menos la proteína P de un virus de ARN de cadena negativa. Por tanto, la invención hace también referencia a un procedimiento para la amplificación de un virus de cadena negativa recombinante conforme a la invención de ARN, comprendiendo los pasos:

- (a) suministro de una célula de amplificación de virus, infectada con un virus de ARN de cadena negativa, conteniendo una mutación en el gen P, que conlleve la pérdida de la replicabilidad del genoma viral sin pérdida de la capacidad de transcripción secundaria, y si fuera necesario, al menos una secuencia codificadora de un producto génico heterólogo, y
- (b) cultivo de la célula huésped en unas condiciones, en las que se lleve a cabo una amplificación del virus.

Otro objeto más de la presente invención es una composición farmacéutica, que contenga un virus de ARN de cadena negativa recombinantes de replicación deficiente y competente en la transcripción, tal y como se ha indicado anteriormente, o su nucleocápside como principio activo, así como, si fuera necesario, como materiales de soporte o/y auxiliares farmacéuticamente habituales. La composición farmacéutica es apropiada para aplicaciones en medicina y veterinaria. Puede emplearse particularmente como vacuna o para la terapia antitumoral, particularmente para el empleo en pacientes de riesgo, como por ejemplo, niños, personas mayores o/y personas con sistema inmunológico dañado o debilitado. La composición farmacéutica puede contener además el virus de ARN de cadena negativa en su envoltura viral nativa.

De manera especialmente preferente el empleo como vacuna, por ejemplo, como vacuna contra patógenos, como virus, bacterias o protozoos. Cuando el virus recombinante contenga un transgénico o varios transgénicos del mismo origen, por ejemplo, a partir de un único patógeno, será una vacuna monovalente. Cuando el virus recombinante contenga transgénicos de diferente origen, podrá utilizarse también como vacuna polivalente, por ejemplo, como vacuna bi- o trivalente. Puede producirse, por ejemplo, una vacuna polivalente contra varios virus patógenos, por ejemplo, contra varios virus patógenos de ARN de cadena negativa, como por ejemplo, virus parainfluenza humano y RSV.

Una vacuna conforme a la invención es capaz de activar una respuesta inmunológica humoral, preferentemente la formación de anticuerpos neutralizantes, o/y una respuesta inmunológica de las células T. De manera especialmente preferente se activan una respuesta inmunológica humoral y una respuesta inmunológica de las células T.

La composición farmacéutica puede existir en forma de disolución, suspensión, de liofilizado o en cualquier otra forma apropiada. La composición puede contener, junto al principio activo, medios para el ajuste del valor del pH, tampones, medios para el ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, así como adyuvantes. La administración puede realizarse por la vía habitual, por ejemplo, oral, tópica, nasal, pulmonar, etc., en forma de aerosoles, líquidos, polvos, etc. Se suministra además una dosis terapéuticamente efectiva a los pacientes, dependiendo esta dosis de la respectiva aplicación (por ejemplo, viroterapia o vacuna), del tipo de enfermedad, del estado de salud y pso del paciente, del tipo de administración y de formulación, etc. Habitualmente se suministran por aplicación de 10^3 a 10^7 partículas víricas, de manera especialmente preferente de aprox. 10^4 a 10^6 partículas víricas. Si fuera necesario, se pueden suministrar conjuntamente varias partículas víricas diferentes, por ejemplo, en el caso de las vacunas combinadas. La administración puede realizarse en una o en múltiples ocasiones, en función de las necesidades.

Son ámbitos de aplicación preferentes, por ejemplo, la prevención y/o tratamiento de enfermedades víricas respiratorias.

La presente invención debería explicarse además con las siguientes Figuras y Ejemplos.

Ejemplos

1. General

La Figura 1 muestra la morfología de un virus Sendai (SeV) según Fields (Virología. Lippincott, Williams y Wilkins (2001), 4ª Ed.; modificada). El genoma consiste en un ARN monocatenario, presente con las proteínas N, P y L en forma de nucleocápside. El nucleocápside está rodeado por una membrana de envoltura, en la que se alojan las proteínas HN y F (compuestas, en cada caso, por una subunidad F₁ y F₂). La proteína M, vinculada al mismo tiempo también con los componentes del nucleocápside, está asociada a la cara interna de la membrana.

El genoma de ARN monocatenario negativamente orientado del virus Sendai tipo salvaje consiste en 15384 nucleótidos. Los genes de las 6 proteínas estructurales se encuentran en la secuencia 3'-N-P/C-M-F-HN-L-5' (Figura 2). Entre los genes hay transiciones de 50-80 nucleótidos, que contienen, en cada caso, una región fuertemente conservada de 22 nucleótidos: la señal de terminación del gen precedente, una secuencia intergénica y la señal de inicio para el siguiente gen. Una unidad formada por señal de inicio, marco de lectura abierto (ORF), si fuera necesario, regiones no-traducidas y señal de terminación se designa como casete de transcripción. Antes del gen N hay una secuencia líder (Id) de 55 nucleótidos de longitud, que se transcribe, evidentemente no se traduce. Detrás del gen L se encuentra la secuencia trailer (tr) de 54 nucleótidos de longitud. Las regiones Id y tr funcionan como promotores genómicos y antígenómicos para la replicación del genoma y/o antígenoma. Las moléculas de ARNm formadas por transcripción son monocistrónicas a excepción del ARN P/C.

El ciclo de amplificación del virus Sendai comprende la entrada en la célula huésped, la transcripción y traducción, así como la replicación y envejecimiento del virus con posterior eliminación de los virus nuevamente producidos. Las proteínas N, P y L intervienen particularmente en la operación de transcripción, representando L la ARN polimerasa dependiente del ARN viral con todas las actividades catalíticas. Como el genoma del virus Sendai se encuentra en orientación de cadena negativa, el ARN viral no puede traducirse directamente a proteínas. Primero se lleva a cabo una transcripción primaria a ARNms mediante ARN polimerasa, que se inserta en la célula asociada al nucleocápside.

La Figura 3 muestra una representación esquemática del modo de transcripción del virus Sendai. El complejo de polimerasa, compuesto por una proteína L y un homotetrámero de proteínas P, se desplaza además sobre el RNA empaquetado con proteínas N en la dirección del extremo 5'. Se lee además la información genética sobre el ARN de cadena negativa genómico y se transcribe en ARNm de cadena positiva.

La replicación del genoma comprende la elaboración de nuevos genomas víricos con polaridad negativa. Para ello se forman primero antígenomas, que sirven entonces como matrices para la formación de los genomas sirven. Como la transcripción comienza en el extremo 3' del genoma (Id), es necesaria una conmutación del modo de transcripción al de replicación. Esta conmutación está determinada por la cantidad de proteína N libre en la célula. Sólo cuando se haya formado suficiente proteína N tras la traducción de las moléculas de ARNm, puede realizarse una replicación. Después de que haya un antígenoma, complejo con proteínas N a lo largo de toda su longitud, éste puede servir de matriz para la producción de otros genomas. Estos se empaquetan asimismo directamente con proteínas N. Las proteínas N, P y L son de nuevo responsables del proceso de replicación (Figura 4).

Durante la replicación vírica se sintetizan también proteínas virales progresivamente mediante el número creciente de moléculas de ARNm. Entonces se transportan los complejos de ARN viral y proteínas virales (nucleocápsides) en forma de vesículas secretoras a la membrana citoplasmática, donde se produce el recubrimiento con proteínas superficiales virales y la gemación de las partículas víricas.

En el contexto de la presente invención se proporcionan mutantes de virus recombinantes, en los que las funciones de transcripción y replicación están desacopladas, es decir, los virus son competentes en la transcripción, pero deficientes en la replicación. La función de replicación faltante del genoma se tiene que compensar para la elaboración de partículas víricas y/o sus nucleocápsides mediante células colaboradoras, que complementan *en trans* la proteína viral ausente o de función deficiente. Una célula colaboradora preferente es la línea celular H29 (Willenbrink y Neubert, J. Virol. 68 (1994), 8413-8417). Esta línea celular se depositó en el contexto de la presente solicitud conforme a las determinaciones del Tratado de Budapest bajo el número de archivo DSM ACC2702 del 05.11.2004. Para la producción de virus de replicación deficiente, pero competentes en la transcripción, no se eliminó completamente el gen codificador de la proteína P, sino sólo un dominio esencial para la replicación del genoma. Así se sabía de trabajos anteriores (Curran, Virología 221 (1996), 130-140; Curran *et al.* J. Virol. 69 (1995), 849-855), que la replicación del genoma se inhibe en un sistema *in vitro* suprimiendo los aminoácidos 2-77 de la proteína P, mientras que la transcripción viral permanece activa.

La Figura 5 muestra una representación esquemática de la proteína P con sus dominios N- y C-terminales (PNT, PCT), el dominio de tetramerización (aminoácidos 320-446), el dominio P:L (aminoácidos 411-445) y el dominio dominio vinculante P:RNP (aminoácidos 479-568). Para una desconexión de la función de replicación del genoma viral con conservación simultánea de la capacidad para la síntesis de ARNm viral, se seleccionó una supresión de los primeros 77 aminoácidos de la proteína P. Se elaboró además por primera vez un mutante apropiado del virus Sendai (SeV-PA2-77), en el que se suprimió la zona 5'-terminal del P-ORF. Este virus sólo puede codificar proteínas P

acortadas en su región N-terminal. Los estudios de infección muestran, que el mutante del virus no puede amplificarse en el cultivo celular. Con ayuda de la línea de células colaboradoras H29 (DSM ACC2702), que proporciona, entre otros, la necesaria proteína P de tipo salvaje, puede lograrse una amplificación del mutante del virus. La eficiencia de la amplificación vírica asciende a aprox. el 45%, en comparación con los virus Sendai de tipo salvaje.

Tras la infección, el mutante del virus conforme a la invención es capaz de producir transgénicos codificados por virus en células infectadas. La proteína P acortada producida por el mutante del virus fomenta suficientemente la síntesis secundaria de ARNm viral. La síntesis de proteínas codificadas por virus se extiende en las células infectadas a lo largo de varios días y es sólo en torno al factor de aprox. 10 menor que la del tipo salvaje de virus, de forma que al emplear el mutante como vacuna pueda esperarse de manera segura una respuesta inmunológica suficiente.

2. Elaboración de Estructuras Básicas para Vectores de Virus Sendai de Replicación Deficiente (SeVV)

2.1 Elaboración de una Construcción de ADNc pSeV-X

Se insertó un casete de transcripción codificador en la zona 3'- del SeV, variedad Fushimi (ATCC VR105). En todas las manipulaciones del genoma se tiene que observar incondicionalmente, que el número total de nucleótidos del genoma recombinante del SeV puede dividirse por seis ("rule of six").

Partiendo del ADNc pSeV empleado como matriz se proporcionaros dos fragmentos de PCR, PCR X I y PCR X II, para la elaboración del pSeV-X (Figura 6).

El PCR X I (370 bp) consiste en la secuencia del promotor de T7 (T7-prom.), de la secuencia líder (Id), el inicio del gen N con 5'-NTR hasta antes del codón de inicio del N-ORF (Open Reading Frame). A través del imprimador inverso X I (+) (Tabla 3) se añadieron una interfaz de restricción *NotI* singular y 24 nucleótidos de la secuencia de parada del gen N. Los 24 nucleótidos de la secuencia de parada del gen N del PCR XI, insertados por el imprimador mutagénico XI (+), sirven en el siguiente paso de fusión como la zona que se solapa con PCR XII.

El PCR XII (970 bp) consiste en la secuencia de inicio del gen N y del primer tercio del N-ORF. A través de un imprimador *forward* XII se añadieron tanto la secuencia del 3'-NTR N y la secuencia de parada del gen N, como también la región intergénica (IR). El imprimador inverso XII (+) se fija en el primer tercio del N-ORF brevemente detrás de la interfaz *SphI* singular en el SeV genoma. El amplicón PCR XI estaba en la zona 3'- complementaria a la zona 5'- del PCR X II. Mediante esta zona solapante podían fusionarse los dos fragmentos de PCR, X I y XII. Después de efectuarse el PCR podía insertarse el producto de fusión (1310 bp) mediante descomposición por restricción con las enzimas *MluI* y *SphI* en el vector pSeV tratado asimismo con *MluI* y *SphI*. A partir de los clones obtenidos se aisló ADN del plásmido mediante preparación del plásmido y mediante análisis de restricción y se comprobó en el secuenciado la correcta inserción del casete de transcripción. La construcción de ADNc pSeV-X estaba, por tanto, disponible.

Para poder seguir fácilmente la elaboración de virus recombinantes, se insertó ahora el gen para la *enhanced green fluorescent protein* - gen mejorado de la proteína verde fluorescente - (eGFP) en el casete vacío del pSeV-X. El eGFP-ORF se amplificó mediante PCR a partir del plásmido de expresión pEGFP-N1 (Fab. Clontech), lográndose con imprimadores mutagénicos el cumplimiento de la "rule of six" y la adición de dos interfaces *NotI* flanqueantes. El fragmento de PCR originado de 771 bp de tamaño se descompuso con la enzima de restricción *NotI* y se aisló un fragmento 738 bp de tamaño mediante elución del gel, que se insertó a través de la interfaz *NotI* del pSeV-X en su casete de transcripción "vacío" pSeV-X. Tras la transformación de *E. coli*, preparación de plásmido y posterior secuenciado del marco de lectura del eGFP insertado a través del PCR estuvo disponible la construcción de ADNc pSeV-eGFP.

2.2 Elaboración de la Construcción de ADNc pSeV-X-X

Con la construcción pSeV-X-X deberían proporcionarse dos casetes de transcripción adicionales, en los que pueden incorporarse dos transgénicos. El empleo de pSeV-X-X como vector base para la elaboración de los vectores de replicación deficiente debería posibilitar dotar al vector de propiedades multivalentes, por ejemplo, trivalentes.

El pSeV-X-X se elaboró a través de una reacción de PCR, en la que el pSeV-X servía como plantilla (Figura 7). El imprimador XX-*forward* se hibridó con pSeV-X en la zona de la interfaz *NotI* y el 3'-NTR del segundo casete de transcripción a integrar. Una interfaz de restricción *SgrA* singular se introdujo con ayuda del imprimador XX-*forward* entre la interfaz *NotI* y el 3'-NTR. Sirve como interfaz singular de restricción para la posterior inserción del ORF de un transgénico. En el producto del PCR XX siguen parada del gen, región intergénica (IR), inicio del gen y 5'-NTR. Mediante el imprimador XX (+), hibridado con el 5'-NTR, se insertaron las interfaces singulares de restricción *FseI* y *NruI* insertado. La interfaz *FseI* sirve para la incorporación del ORF de un segundo transgénico. La interfaz singular *NruI* se clonó previsoriamente, para poder integrar, si fuera necesario, un tercer casete de transcripción. El imprimador XX (+) se hibridó en la zona 3'- con la secuencia de la interfaz *NotI* del pSeV-X. El producto del PCR XX (220 bp) se trató con la enzima de restricción *NotI* y ein fragmento de 144 bp mediante extracción con gel se aísla. Este fragmento, concebido en cumplimiento de la "rule of six", podrá incorporarse entonces en el plásmido pSeV-X tratado asimismo con *NotI*. Tras la verificación de la correcta orientación del fragmento XX de *NotI* PCR y

verificación de la secuencia estuvo listo el plásmido pSeV-X-X. En las interfaces *SgrAI* y *FseI* singulares se pueden integrar transgénicos cualesquiera.

Para las investigaciones en este trabajo se proporcionó a los dos casetes de transcripción (X) de pSeV-X-X un marco de lectura de dos proteínas fluorescentes diferentes. Por un lado, se amplificó el marco de lectura para la proteína fluorescente eGFP a partir del plásmido de expresión pEGFP-N1 mediante reacción PCR en cumplimiento de la “rule of six”, añadiéndose con ayuda de imprimadores mutagénicos dos interfaces *SgrAI* flanqueantes. Tras la descomposición por restricción con *SgrAI* y elución del gel podía incorporarse el fragmento de aprox. 738 bp de tamaño en el primer casete de transcripción de pSeV-X-X (pSeV-eGFP-X). Del mismo modo se proporcionaron, por otro lado, al ORF de la proteína fluorescente DsRed (a partir del plásmido “pDsRed”, Fab. Clontech), en cumplimiento de la “rule of six” y a través de reacción PCR, las interfaces de restricción de *FseI*, el ADN se descompuso y elucionó en gel y este fragmento (702 bp) se clonó finalmente en el segundo casete de transcripción en la zona 3’- de pSeV-eGFP-X. Se produjo la construcción pSeV-eGFP-DsRed genómica de SeV ADNc.

3. Elaboración de Vectores de Virus Sendai de Replicación Deficiente (SeVV)

Se elaboraron construcciones de ADNc pSeVV-eGFP-ΔP, que codificaran virus Sendai de replicación deficiente, en los que se ha suprimido el gen para la proteína P. Para ello se tuvo que suprimir un marco de lectura del gen P en cumplimiento de la “rule of six”- regla del seis -, debiendo conservarse un casete de transcripción no-codificador en la posición apropiada (Figura 8A).

Mediante la incorporación de una interfaz de restricción en vez del ORF suprimido, debería haber otro casete funcional de transcripción en la construcción de ADNc pSeVVeGFP -ΔP para posteriores aplicaciones, en el que pueda insertarse, si fuera necesario, otro transgénico.

Como variante adicional de un SeVV de replicación deficiente se elaboró el mutante de supresión pSeVV-eGFP-PA2-77, que codifique una proteína P acortada N-terminalmente, a la que le falten los aminoácidos 2 a 77 (Figura 8B).

La clonación de pSeVV-eGFP-ΔP debería describirse detalladamente en el siguiente párrafo.

3.1 Clonación de las Construcciones de ADNc pSeVV-eGFP-ΔP y pSeVV-eGFP-PA2-77

El ORF de la proteína P se extrajo de la construcción de ADNc del virus competente en la replicación pSeV-eGFP, para preparar el nuevo ADNc pSeVV-eGFP-ΔP, que codifique los vectores de replicación deficiente. En vez del P-ORF se empleó un interfaz de restricción *XhoI*.

Para la clonación de pSeVV-eGFP-ΔP se produjeron dos fragmentos de PCR denominados PCR ΔP I y PCR ΔP II y, a continuación, se fusionaron. Como plantilla para las dos reacciones de PCR sirvió el pSeV-eGFP. En el fragmento PCR ΔP I (1272 bp) se obtuvo, a través del imprimador *forward* ΔP I (= N-578; Tabla 3), una hibridación con la plantilla en la zona del NORF antes de una posición *SphI* singular. El imprimador inverso ΔP I (+) se hibridó con la plantilla en la zona 5’-NTR del gen P hasta antes del codón del ATG de P e insertó allí la interfaz de restricción *XhoI*.

El fragmento PCR ΔP II consiste en 1938 bp, sirviendo también aquí el pSeV como plantilla. El imprimador *forward* ΔP II se hibridó con una parte de la secuencia 5’-NTR P y enganchó una interfaz *XhoI*. El imprimador inverso de PCR ΔP II (+) se fija en el ORF del gen F detrás de una posición *Eco47III* singular y presenta adicionalmente una posición *MluI* artificial.

Ambos fragmentos de PCR, ΔP I y ΔP II, se enlazaron a través de la posición *XhoI*. El producto de fusión- compuesto por una secuencia parcial del N-ORF, el casete de transcripción de P no-codificador con interfaz de restricción *XhoI* insertada, el M, así como una cuarta parte del F ORF - se descompuso con las enzimas de restricción *SphI* y *MluI*, se entreclonó y se verificó su secuencia. De un subclon con la secuencia correcta se cortó un fragmento *SphIEco47III* de 3006 bp de tamaño, que se ligó en el vector pSeV-eGFP tratado idénticamente. Un clon pSeVV-eGFP-ΔP apropiado (ADNc viral genómico) está ahora disponible, tras la verificación de la secuencia, para la elaboración del SeVV-eGFP-ΔP de replicación deficiente (Figura 9).

Para la construcción del mutante por supresión pSeVV-eGFP-PO2-77 se empleó un PCR con dos imprimadores mutagénicos. El imprimador *forward* “*XhoI* PA2-77” contiene una posición *XhoI*, seguida de un codón de inicio de ATG, así como codones para los aminoácidos 78 s 86 de la proteína P. El imprimador inverso “PA2-77 (+) *XhoI*” contiene los 10 últimos codones de la proteína P y una posición *XhoI*. El marco de lectura de la proteína P acortada N-terminalmente unos 76 aminoácidos se elaboró por medio de PCR, partiendo de la plantilla pSeV, en cumplimiento de la *rule of six*. El fragmento descompuesto por *XhoI*, de 1488 bp de tamaño, se insertó a través de dos pasos de clonación en el casete de transcripción de pSeVVeGFP-ΔP no-codificador en la posición del P-ORF inicial. Tras la verificación de la secuencia hubo ahora también un clon de ADNc genómico disponible para la elaboración del SeVV-eGFP-PA2-77 de replicación deficiente.

La supresión de los codones 2 a 77 en el P-ORF tiene como consecuencia que, en el caso de las proteínas no-estructurales, también la proteína está acortada N-, V- y W- terminalmente y permanece codificada por la familia C

sólo aún C' - asimismo truncada -; las proteínas C, Y1 y Y2 no pueden seguirse traduciendo, debido al codón de inicio ausente, por el ARNm acortado.

La secuencias de imprimadores para la clonación de pSeVV-eGFP-ΔP se enumeran en una lista de los oligonucleótidos de ADN empleados (Tabla 3). Los productos de PCR producidos, PCR I y PCR II, se fusionaron y se amplificaron con ayuda del imprimador forward del PCR I y del imprimador inverso del PCR II. A continuación se descompusieron los productos de fusión del PCR con enzimas de restricción, presentes singularmente en los pSeV-eGFP y que autorizan la inserción del producto de fusión apropiado en pSeV-eGFP (por ejemplo: *NarI* durante la clonación de pSeVV-eGFP-ΔN, ver Tabla 1). El producto de fisión purificado se insertó mediante ligadura en el vector pSeV-eGFP digerido asimismo con las enzimas apropiadas.

TABLA 1

Panorámica de los Imprimadores e Interfaces de Restricción Empleados Durante la Clonación del pSeVV-eGFP-ΔP

	pSeVV-eGFP-ΔP
Par de Imprimadores PCR I	ΔPI, ΔP I (+)
Par de Imprimadores PCR II	ΔP II, ΔP II (+)
RSS¹ del casete de transcripción	<i>XhoI</i>
RSS⁵ de la clonación	<i>SphI</i> + <i>Eco47III</i>
§ RSS = interfaz de restricción	

Las células de *E. coli* se transformaron con una parte de los insertos por ligación y se aisló el ADN de plásmido de los clones obtenidos mediante mini-preparación de plásmidos. Tras la verificación de la secuencia correcta mediante análisis de restricción y secuenciado se produjo una preparación de plásmido (ADN Maxi Prep-Kit, Qiagen) a partir de un clon positivo, y así hubo pSeVV-eGFP-ΔP listo para la producción de mutantes por supresión recombinantes.

4. Elaboración de Mutantes del Virus de Replicación Deficiente

A partir de las construcciones de ADNc pSeVV-eGFP-ΔP se sintetizaron vectores SeV de replicación deficiente (SeVVeGFP-ΔX) en cultivo celular.

4.1 Producción Inicial de SeVV-eGFP-ΔP

Para la producción de SeV recombinante con genoma completo se infecta

- o bien la línea celular "BSR-T7", que sintetiza la T7 ARN polimerasa de manera estable (Buchholz *et al.* (1999) J. Virol. 73, 251-259)
- o cultivos celulares con el virus Vaccinia recombinante MVA-T7, que sintetiza la T7 ARN polimerasa (Sutter *et al.* (1995) FEBS 371, 9-12), y
- se transfecta con el ADNc del genoma viral (pSeV), así como los genes N, P y L codificados por plásmido (pTM-N, -P, -L; Elroy-Stein *et al.* (1989) PNAS 86, 6126-6130). La T7-polimerasa transcribe ahora el antígeno viral o/y la secuencia complementaria y los genes N, P y L. La proteína sintetizada a través de pTM-N empaqueta al ADN antígeno y/o complementario viral sintetizado, y este núcleo del nucleocápside (RNP) forma, junto con las proteínas P y L, el complejo de replicación a través del ARN genómico nuevamente producido y puede empaquetarse para formar nucleocápsides (Leyrer *et al.*, J. Virol. Meth. 75 (1998), 47-55). Posteriormente se lleva allí a cabo la transcripción de todas las proteínas codificadas por virus y la replicación de otros genomas virales (Figura 10).

En contraste con la producción de SeV wt recombinante con genoma completo descrita, en el ADNc codificado por plásmido de pSeVV-eGFP-ΔP falta la información genética para el gen P. Por consiguiente, los nucleocápsides inicialmente producidos sólo son capaces de sintetizar los genes N, P y L. La cantidad de proteína ausente necesaria para la amplificación de los nucleocápsides de SeVV-eGFP, -ΔP tiene que proporcionarse, por tanto, exclusivamente a través de la expresión controlada por promotor de T7 del gen P codificado por plásmido.

La producción de SeVV-eGFP - Δ P de replicación deficiente se efectuó de manera análoga a la producción de variantes de SeV competentes en la replicación en células HeLa (ATCC CCL2) o células BSR-T7. Después de una incubación de 48 h de duración de las células HeLa se estudió, si se han desprendido partículas virales de SeVV-eGFP - Δ P en los excesos del cultivo y cuántos mutantes por supresión iniciales se han producido.

4.2 Detección de SeVV-eGFP - Δ P Producidos Inicialmente

Los excesos de células HeLa o células BSR-T7, en las que debería producirse inicialmente SeVV-eGFP - Δ P, se estudiaron para analizar la presencia de estos vectores virales. El SeVV-eGFP - Δ P tiene, en comparación con el SeV wt recombinante, el gen reportero para eGFP integrado en la zona 3'. Este marcador de detección se emplea ahora para analizar cuántos SeVV-eGFP - Δ P se han formado.

En insertos paralelos se co-infectaron 5×10^5 células Vero (ATCC CCL18) con 1 ml de sobrenadante del cultivo celular de las células HeLa transfectadas durante la producción inicial de SeVV-eGFP - Δ P y simultáneamente con SeV wt (MOI = 3) para la transcomplementación de la proteína ausente. Como control se infectaron células Vero o bien sólo con 1ml de SeV-eGFP producido inicialmente o con SeV-eGFP producido inicialmente y simultáneamente con SeV wt (MOI = 3).

El resultado de la co-infección de las células con los sobrenadantes del cultivo de producción de SeVV-eGFP - Δ P y SeV wt muestra que el mutante del virus SeVV-eGFP- Δ P puede producirse inicialmente y es capaz, tras la producción inicial, de infectar células, lo que puede detectarse mediante una expresión transgénica eGFP comprobable. Inicialmente pueden producirse aprox. 13×10^2 SeV-eGFP, $3,2 \times 10^2$ mutantes del virus SeVV-eGFP- Δ P.

5. Amplificación de SeVV-eGFP- Δ P

Se estudió, si los vectores SeVV-eGFP- Δ P pueden propagarse, es decir, si son biológicamente funcionales. La replicabilidad debería analizarse primero mediante suministro de las proteínas del gen P ausente mediante transcomplementación viral con SeV.

5.1 Comprobación de la Propagabilidad del SeVV-eGFP- Δ X

Primero tuvo que comprobarse que los mutantes fueran capaces, para una transcomplementación apropiada por parte del virus SeV wt, de amplificarse e infectar además a las células circundantes. Para la investigación de la propagabilidad de SeVV-eGFP- Δ P se ofrece de nuevo la co-infección de las células con SeVV-eGFP- Δ P y SeV wt. Las células se infectaron en este ensayo con SeV wt en bajo MOI, se co-infectaron con SeVV-eGFP- Δ P y se incubaron a lo largo de varios días, para poder detectar así la propagación de los vectores SeVV-eGFP- Δ P mediante el número creciente de células fluorescentes.

5×10^5 células Vero se infectaron simultáneamente con, de media, 100 SeVV-eGFP - Δ P y SeV wt producidos inicialmente (MOI = 0,2). La co-infección de las células Vero con aprox. 100 partículas del virus SeV-eGFP y SeV wt competente en la replicación sirvió como control positivo. Durante una fase de incubación de 48 h de duración pudo observarse una amplificación de los tres mutantes por supresión: Primero se volvieron fluorescentes en cada caso sólo las células Vero individuales, que hubieran sido co-infectadas con SeVV-eGFP- Δ P y SeV wt. Después de aprox. 24 h se liberaron de estas células nuevas partículas víricas sintetizadas, capaces ahora de penetrar en tiempos consecutivos. Si se infectaran estas células Vero de nuevo simultáneamente con SeVV-eGFP- Δ P y SeV wt, se produciría asimismo en estas células un fenómeno de fluorescencia detectable. La amplificación de SeV-eGFP- Δ P, en células co-infectadas con wt pudo detectarse mediante esta "formación de la cola" de células fluorescentes 48 horas después y posteriormente.

Con este ensayo se garantizó que las contrucciones genómicas de ADNc, a partir de las cuales se produce el SeVV-eGFP- Δ P, sean funcionales en todas las regiones. Pudo demostrarse además, que es posible una amplificación del mutante del virus añadiendo la proteína viral ausente. La proteína (por ejemplo, P) producida exclusivamente por virus wt es suficiente para amplificarlos a ambos, el mutante por supresión y el wt, es decir, también una cantidad posiblemente subóptima de proteína P conlleva la formación de nucleocápsides funcionales de SeV wt y SeVV-eGFP- Δ P. Suministrando la proteína ausente mediante el participante en la transcomplementación SeV wt pudo obtenerse una amplificación visible del SeVV-eGFP- Δ P, medida por el aumento de células fluorescentes en los insertos de cultivo.

5.2 Determinación de las Proteínas Necesarias para la Amplificación de SeVV-eGFP- Δ P

A continuación se estudió qué proteínas tendrían que suministrarse en el caso de la amplificación de SeVV-eGFP- Δ P mediante una célula colaboradora, debiendo sintetizarse las proteínas SeV N, P y L independientemente. Para una síntesis independiente de las proteínas SeV N, P y L se suministraron los tres virus Vaccinia recombinantes (VV) W-N, W-P, W-L, que producen las proteínas SeV N, P ó L recombinante (Graef, H. (1994) Caracterización Funcional de las Proteínas del Virus Sendai Large Recombinante (L). Disertación, Universidad Eberhard-Karis, Tübingen).

Se co-infectaron 1×10^6 células Vero simultáneamente con SeVV-eGFP- Δ P o SeV-eGFP (MOI = 0,01) y VV. W-N, -P y -L se emplearon además individualmente o en combinaciones (MOI = 0,5). Después de un tiempo de adsorción de una hora se efectuó un cambio de medio con DMEM + 10% del suero de ternera fetal (FKS) + citosina-arabinósido

(AraC) (100 mg/ ml) y las células se incubaron durante 72 h a 33°C, cambiándose el medio diariamente, para absorber nuevo AraC.

La propagación de SeVV-eGFP-ΔP se analizó tras 72 h a través de la expresión eGFP. En este tiempo apareció en los insertos positivos una amplificación de las células fluorescentes verdes de una célula inicial hasta 10-30 células fluorescentes adyacentes.

Los resultados de la investigación de qué proteínas SeV son necesarias para amplificar al SeVV-eGFP-ΔP en las células Vero, se resumen en la Tabla 2. El SeVV-eGFP-ΔP puede proliferar en solitario mediante la expresión de las proteínas SeV P con ayuda de VV-P en las células Vero.

TABLA 2

Proteínas SeV Necesarias Para la Amplificación de SeVV-eGFP-ΔP

	Amplificación <i>in vitro</i> por medio de VV	
SeW-eGFP-ΔP	P +	(N + P) +

Para la amplificación del SeVV-eGFP-ΔP basta la expresión de proteína SeV P en la célula colaboradora.

5.3 Asistencia a la amplificación de SeVV-eGFP-ΔP mediante células colaboradoras H29

Para las investigaciones para la amplificación de SeVV-eGFP-ΔP con ayuda de la línea celular H29 se infectaron 1 x 10⁶ células H29 en cuatro insertos diferentes con aprox. 100 partículas víricas -ΔP producidas inicialmente en las células HeLa y/o como control para la amplificación exitosa de SeV capaz de replicarse en células H29 con aprox. 100 partículas víricas de SeV-eGFP. En el periodo de tiempo de 1 a 10 días después se efectuó la investigación de la amplificación de SeVV-eGFP-ΔP mediante comprobación de una propagación en forma de cola de las células fluorescentes (formación de manchas), partiendo de una célula H29 inicialmente infectada.

En el experimento de control pudo observarse, 3 días después, una amplificación de SeV-eGFP, partiendo de células fluorescentes singulares, 1 día después, hasta formar manchas con hasta 50 células fluorescentes. Se garantizaba, por tanto, que se produjera una amplificación de SeV mediante el montaje experimental seleccionado.

En el inserto con SeW-eGFP-ΔP pudieron detectarse 1 día después en las cien células individuales infectadas inicialmente. 3 días después, aprox. un 70% de las células fluorescentes individuales, se había desarrollado hasta formar manchas, con hasta 30 células fluorescentes. Por tanto, pudo observarse evidentemente una difusión del SeVV-eGFP-ΔP a las células H29 circundantes. Junto a las células H29 (un derivado de las células renales 293 humanas) son también apropiados los derivados de células Vero (células renales del cercopiteco verde africano) y derivados de células LLCMK2 (células renales del mono resus), transfectados de manera estable con gen SeV P, o con genes SeV P y N, para la amplificación vírica. Por tanto, es posible por primera vez amplificar un vector viral SeV, cuyo P-ORF se haya suprimido. En el siguiente subpunto debería tratarse de la caracterización de la amplificación de SeVV-eGFP-ΔP.

5.4 Amplificación de SeVV-eGFP-ΔP a las Células H29s

El SeVV-eGFP-ΔP puede amplificarse mediante las proteínas SeV P producidas por las células colaboradoras H29. Los mutantes con supresión de P liberados son capaces de infectar las células H29 circundantes. La propagación del tipo SeVVeGFP-ΔP se analiza ahora en comparación con la propagación del SeV-eGFP competente en la replicación.

Para ello se infectaron 1 x 10⁶ células H29 con, de media, 100 SeVV-eGFP-ΔP o SeV-eGFP. A los 3,5 y 10 días se efectuó la detección de células verdes fluorescentes con ayuda del microscopio de fluorescencia.

Una amplificación de SeVV-eGFP-ΔP pudo efectuarse con éxito mediante el suministro celular de proteínas P de SeV. En todos los instantes a estudiar pudo reconocerse que el SeVV-eGFP-ΔP y SeV-eGFP se propagan eficientemente a las células H29.

En contraste con esto, no pudo observarse una propagación de SeVV-eGFP-ΔP a las células, que no proporcionen la proteína P ausente ("células objetivo", por ejemplo, células Vero), lo que confirma la deficiencia en la replicación de SeVVeGFP-ΔP (ver punto 8).

5.5 Expresión Génica de SeVV-eGFP-ΔP en Células Objetivo Infectadas

Pudo verificarse una ausencia de la amplificación de SeVV-eGFP-ΔP sobre tipos celulares, que no proporcionen la P proteína *en trans*. La potencia de expresión quedó, al mismo tiempo, muy por detrás de las expectativas.

De manera similar que en caso del mutante del virus de la rabia ΔP (Shoji *et al.* (2004) Virología 318, 295-305), sólo unas pocas células infectadas muestran una débil fluorescencia de eGFP (menor del 5%; ver Figura 11), aunque estadísticamente, para un MOI = 1, se infectó realmente aprox. un 70% de las células con cualquier partícula vírica. También para un mayor MOI = 5 sólo pueden observarse células Vero luminosas verdes aisladas mediante SeVV-eGFP- ΔP (ver Figura 12, arriba a la izquierda).

Esto confirma la suposición de que, tras la infección de una célula con un virus deficiente en gen P, sólo es posible una transcripción primaria a través del complejo de polimerasa arrastrado desde la partícula vírica. En el caso del mutante SeV ΔP -, aparte de esto, aparentemente sólo un pequeño porcentaje de partículas infectantes es capaz de eso y/o sólo puede observarse una expresión génica, cuando haya varios nucleocápsides transcribibles simultáneamente en una célula.

Para un empleo terapéutico de este SeVV de replicación deficiente, la potencia de expresión parece demasiado débil y/o deberían aplicarse desproporcionadamente muchas partículas de SeW ΔP por paciente. Resulta, por tanto, deseable, emplear una variante de SeV de replicación deficiente, que realice también una transcripción secundaria. Esto conlleva el desarrollo de otros complejos de polimerasa modificados, que no puedan replicar el genoma viral, pero sean capaces de una expresión elevada del gen y/o antígeno terapéuticos.

6. Elaboración de una Construcción de ADNc SeVV-eGFP- ΔP Modificada

Para mejorar eventualmente la potencia de transcripción de SeVV deficiente en gen P en la célula objetivo, se elaboró otra construcción recombinante, que codifique, en la posición del marco de lectura de P inicial, una forma de la proteína P acortada N-terminalmente unos 76 aminoácidos ("pSeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77"; ver punto 3.1 y Figura 8B).

La generación de partículas de SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77 y su amplificación se efectuaron de manera análoga al punto 4.1 y 5.4.

6.1 Comportamiento de Crecimiento de SeW-eGFP- P $\Delta 2$ -77 en Células Colaboradoras H29

En las células colaboradoras H29 infectadas con SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77 se sintetiza la proteína de P $\Delta 2$ -77, acortada N-terminalmente unos 76 aminoácidos y codificada por virus junto con la proteína P celularmente codificada.

Para examinar la influencia de la expresión de la proteína P acortada P $\Delta 2$ -77 sobre la replicación viral, se efectuó una infección (MOI = 3) de células H29 con SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77, SeV-eGFP- ΔP o el virus de control SeVeGFP de manera análoga al procedimiento descrito bajo cinética de crecimiento de SeVV-eGFP- ΔP . Los sobrenadantes de los insertos individuales se determinaron a lo largo de un periodo de tiempo de 120 h mediante un ensayo de dosificación de infección celular de los títulos de los virus descendientes a través del número de células productoras de eGFP.

De una célula H29 infectada con SeV-eGFP (control positivo) se libera una media de 80 partículas víricas en el periodo de tiempo de 120 h, no precisándose en este caso ninguna transcomplementación de la proteína P por parte de las células H29. El SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77 podía proliferar en el sistema de transcomplementación de H29 con aprox. la misma eficiencia que el SeVV-eGFP- ΔP : de las células H29 infectadas se liberan, tras 120 h, aprox. 20×10^6 partículas víricas de SeVV-eGFP- ΔP o SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77, esto corresponde a un número de aprox. 40 partículas víricas de los mutantes P liberadas por célula H29.

7. Comparación de la Expresión Génica de SeVV-eGFP- ΔP y SeVV- eGFP -P $\Delta 2$ -77 y Cuantificación de la Síntesis de Proteínas en Células Objetivo Infectadas

Para estudiar, si el vector SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77 muestra una expresión transgénica reforzada - comparada con el SeVV-eGFP- ΔP - en las células objetivo infectadas, se caracterizó detalladamente la expresión codificada por virus del gen reportero eGFP, así como de la proteína HN.

5×10^5 células Vero se infectaron con SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77 (MOI = 1), pudiendo observarse al 2º día un 70% de células Vero fluorescentes (no mostrado). Esto significa que casi cada complejo RNP de esta variante del vector viral es capaz de inducir una transcripción medible en la célula objetivo.

7.1 Cuantificación de la Expresión eGFP Mediante Análisis FACS

El casete de transcripción, en el que se insertó el gen reportero eGFP en SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77, debería codificar el antígeno de un patógeno, por ejemplo, de un virus deseado en posteriores aplicaciones en el ámbito médico. Esta expresión antigénica tiene que bastar para originar una respuesta inmunológica protectora en el paciente.

Para garantizar que cada nucleocápside de SeVV-eGFP-P $\Delta 2$ -77, que infecte una célula objetivo, sea capaz de llevar a cabo una expresión transgénica detectable, debería infectarse el mismo número de células H29 y Vero con la misma cantidad de partículas víricas y comparar, por medio de análisis FACS (*fluorescent activated cell sorting*) y con empleo de un citómetro de flujo FACS-Calibur, el número de células H29 y/o Vero productoras de eGFP. Los datos son evaluados por histograma con ordenador, representando las señales de fluorescencia de las células infectadas frente al número total de células.

2,5 x 10⁵ células Vero o células H29 se infectaron con SeVV-eGFP-PΔ2-77 o con el virus SeVVeGFP-ΔP deficiente en gen P con un MOI = 1. El análisis FACS de las muestras se efectuó 24 h después de la infección. Las células infectadas se absorbieron en PBS y se determinó flujocitométricamente el número de células fluorescentes. El resultado se indica en la Figura 11 como proporción [%] de células Vero y H29 fluorescentes.

24 h tras la infección de las células colaboradoras H29 con SeVV-eGFP-ΔP pudo detectarse un 86% de células H29 productoras de eGFP mediante análisis FACS. La síntesis celular de la proteína P refuerza aquí la formación de nuevos complejos P:L y, por tanto, la producción de nuevo ARNm, lo que conlleva la síntesis de proteínas eGFP en la célula infectada. Si, por el contrario, se infectaran células Vero con SeVV-eGFP-ΔP, no podría comprobarse ni 24 h después, ni en un momento posterior, en otros ensayos experimentales, una expresión de la proteína eGFP. Los complejos P:L transferidos por los nucleocápsides de SeVV-eGFP-ΔP no son capaces, para una infección con MOI = 1, de ocasionar una expresión detectable en las células Vero infectadas.

24 h después de la infección con SeVV-eGFP-PΔ2-77 pudieron identificarse, por el contrario, mediante análisis FACS, apenas un 80% de células H29 productoras de eGFP y un 75% de células Vero productoras de eGFP. Durante la infección de células H29, la transcripción del eGFP ARNm puede reforzarse mediante la síntesis celular de la proteína P y por tanto, mediante nuevos complejos P: L. Durante la infección de células Vero con SeVV-eGFP-PΔ2-77, la transcripción se refuerza mediante la nueva síntesis de la proteína P PΔ2-77 acortada N-terminalmente.

A partir de estos resultados puede encontrarse una importante afirmación acerca del número de SeVV-eGFP-PΔ2-77 capaz de transcribir: se infectaron células H29 y células Vero con un MOI de 1. Las infecciones múltiples de una célula que aparecen teóricamente son igual de poco probables estadísticamente en ambos insertos. 24 h después pudieron identificarse apenas un 80% de células H29 productoras de eGFP y aprox. un 75% de células Vero productoras de eGFP. De este modo se puede deducir, que cada complejo de RNP con la variante de P acortada PΔ2-77, capaz de la expresión transgénica en una célula colaboradora P, produce asimismo una expresión transgénica en la célula objetivo infectada. En contraste con esto, la variante SeVV-eGFP-ΔP con una supresión completa del P-ORF no cumple esta propiedad.

7.2 Ensayo de Funcionalidad de la Proteína HN Producida en las Células Objetivo Infectadas

Con ayuda de un ensayo de hemoadsorción (HAD) se detectó la eficiencia del enlace de eritrocitos humanos y, por tanto, la eficiencia de la exposición de las proteínas HN virales a las células infectadas individuales (Figura 12).

5 x 10⁵ células Vero se infectaron con SeVV-eGFP-PΔ2-77 para un MOI pequeño = 0,5. En contraste con esto, tuvieron que infectarse células Vero en el caso de SeVV-eGFP-ΔP con un MOI 10 veces mayor (= 5), para poder observar generalmente células fluorescentes individuales. Después de una adsorción de 1 h de duración, se efectuó un cambio de medio con DMEM + 10% de FKS. A continuación se incubaron las células varios días a 33°C. La expresión transgénica de ambas variantes de vector se observó primero de nuevo a través de la fluorescencia de eGFP. En los días 5 y 9 posteriores se efectuaron series de ensayos HAD, para analizar la exposición de las proteínas HN virales en base al enlace de eritrocitos humanos.

Aunque en el caso de SeVV-eGFP-ΔP para un MOI = 5, estadísticamente un 99,3% de las células Vero deberían estar infectadas, sólo un 0,01% de las células eGFP-positivas pudo examinarse al microscopio (Figura 12, arriba a la izquierda). Por el contrario, con SeVV-eGFP-PΔ2-77 puede verse una fluorescencia verde para un MOI = 0,5 tal y como se esperaba, en un 40% de las células (Figura 12, abajo a la izquierda).

Dos días tras la infección con SeVV-eGFP-ΔP, sólo la mitad de las células eGFP-positivas (25 de 5x 10⁵ infectadas) es capaz de fijar los eritrocitos a su superficie (Figura 12, arriba centro). Después de otra incubación y ensayo HAD repetido no tuvo lugar ninguna adsorción más de eritrocitos en las células infectadas. Con la segunda variante SeVV de replicación deficiente, SeVV-eGFP-PΔ2-77, pudieron obtenerse de nuevo resultados considerablemente mejores: 5 días tras la infección, aprox. un 40% de las células infectadas (MOI = 0,5) fue capaz de fijar eritrocitos a su superficie (Figura 12, abajo centro). En las células individuales pudo observarse además una actividad de enlace diferente de 10 a 70 corpúsculos sanguíneos rojos complejados. Se ha demostrado, por tanto, que las células infectadas con SeVV-eGFP-PΔ2-77 son capaces, 5 d después, de exponer las proteínas HN a la superficie celular, el ensayo HAD funcional puede evaluarse como positivo. Al mismo tiempo pudo determinarse una expresión eficiente de la proteína HN en las células infectadas en base a la diferente cantidad de eritrocitos enlazados.

Las células infectadas se incubaron ulteriormente a 33°C, produciendo la actividad de la neuraminidasa de la proteína HN la sustitución de los eritrocitos enlazados a las células infectadas. Las células se lavaron, para eliminar los eritrocitos desprendidos, y se incubaron durante otros 4 d a 33°C. Al 9º día después se efectuó de nuevo un ensayo HAD. Ahora pudieron detectarse aprox. un 30% de células Vero HAD-positivas. El número de corpúsculos sanguíneos rojos enlazados se redujo además a de 5 a 20 eritrocitos por célula.

Por consiguiente, 9 días después se sintetizó aún suficiente HN funcional mediante la variante de replicación deficiente SeVV-eGFP-PΔ2-77. En contraste con esto, la variante SeVV-eGFP-ΔP con una supresión completa del P-ORF no cumple estas propiedades.

7.3 Cuantificación de la Expresión eGFP Mediante Análisis de Western Blot

Se efectuó una estimación semi-cuantitativa de la expresión eGFP del vector SeV de replicación deficiente en comparación con el SeV-eGFP competente en la replicación mediante un análisis de Western Blot por medio de filas seriales de dilución de proteína celular total.

5 x 10⁵ células Vero se infectaron con SeVeGFP o SeVV-eGFP-PΔ2-77 (MOI = 3). 24 h después se efectuó la disgregación de las células; los extractos celulares se aislaron en filas seriales de dilución (1:2) de 20 mg a 2,5 mg de cantidad total en un SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF y se demostró primero la proteína eGFP codificada por virus (26 kDa) mediante análisis de Western Blot (Figura 13).

La proteína fluorescente eGFP pudo comprobarse tanto en células Vero infectadas por SeV-eGFP como también por SeVV-eGFP-PΔ2-77 con ayuda del análisis de Western Blot. Una comparación de las intensidades de las señales eGFP permite la afirmación de que la expresión - procurada a través del SeVV-eGFP-PΔ2-77 de replicación deficiente - es aprox. un factor 16 menor, en comparación con el SeV-eGFP competente en la replicación.

Una reducción en torno al factor 16 es además baja y permite la afirmación de que el SeVV-eGFP-PΔ2-77, a pesar de la proteína P modificada, puede producir una transcripción secundaria muy eficiente.

7.4 Estimación de la Expresión HN Mediante Análisis de Western Blot

La proteína SeV HN es, al contrario que la proteína eGFP, una proteína superficial de membrana continua y representa un determinante importante de los antígenos. Mediante la cuantificación relativa de la fuerza de expresión de la proteína HN en células infectadas por SeVV-eGFP-PΔ2-77 se posibilitó una afirmación acerca de la intensidad de la expresión del antígeno de SeV HN.

Se efectuó una estimación semi-cuantitativa de la expresión HN del vector SeV de replicación deficiente, en comparación con el SeV-eGFP competente en la replicación, mediante un análisis de Western Blot por medio de filas seriales de dilución de proteína celular total. Cada 5 x 10⁵ células Vero se infectaron en 2 insertos paralelos con SeVeGFP o SeVV-eGFP-PΔ2-77 (MOI = 1) y se incubaron durante 24 h y/o 48 h. Posteriormente se efectuó la disgregación de las células; los extractos celulares se aislaron en filas seriales de dilución (1:2) de 16 mg a 2 mg de cantidad total en un SDSPAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF y se demostró la proteína HN codificada por virus (60 kDa) con ayuda de un anticuerpo HN monoclonal (Figura 14).

La proteína HN pudo detectarse eficientemente en las células Vero infectadas por SeV-eGFP, tras ambos tiempos de incubación, en todas las trazas (de 16 a 2 mg de proteína total; trazas 2-5 a izquierda y derecha). En el caso de SeVV-eGFP-PΔ2-77 puede verse la facción de la proteína HN aún en las trazas con 16 y 8 mg de proteína total (traza 7, 8), aunque con menor intensidad. La cuantificación relativa de la expresión HN en células Vero infectadas por SeVV-eGFP-PΔ2-77 frente a SeV-eGFP se efectuó mediante la comparación de las trazas con 16 y 8 mg vs. 2 mg de proteína total (trazas 7 y 8 vs. 5, a izquierda y derecha) y permite una reducción estimada de la expresión HN en torno al factor 8 - 16 de la variante de supresión de P, independientemente del tiempo de incubación. Esto sugiere una velocidad de transcripción relativamente alta en células objetivo infectadas por SeVVeGFP-PΔ2-77 y, por tanto, una expresión transgénica generalmente alta del vector viral de replicación deficiente.

Incluyendo ambas medidas (proteína eGFP y HN) puede partirse de una reducción media de la expresión en torno a un factor 10.

8. Deficiencia en la Replicación de SeVV-eGFP-PΔ2-77 en la Célula Objetivo

Si se infectan células Vero con el SeV-eGFP competente en la replicación, se origina en los dos días siguientes una mancha de hasta mil células fluorescentes adicionales en torno a la célula muy fluorescente infectada inicialmente. Para comprobar la deficiencia en la replicación de SeVV-eGFP-PΔ2-77 en las células Vero, debería conformarse ahora la ausencia de este aumento de las células verdes fluorescentes en torno a la célula objetivo inicialmente infectada, considerando el ratio natural de división de las células Vero. Las células Vero se dividen de promedio cada 24 h. Si se infectan las células Vero con SeVVeGFP-PΔ2-77, puede verse una expresión de eGFP detectable después de aprox. 24 h. Se ha observado que, tras otras 24 h de fase de incubación, se originan, debido a la división natural, en algunos casos, dos células hermanas (más debilmente) fluorescentes a partir de esta célula Vero fluorescente inicialmente infectada. Esta observación no tiene nada que hacer con una amplificación vírica, en la que pueden liberarse de 10¹ a 10⁴ partículas víricas de una célula objetivo infectada, que puedan infectar entonces a las células adyacentes. Este ratio de división natural de las células infectadas tiene, por otro lado, una influencia sobre la fuerza de expresión del eGFP, que se reduce al aumentar el número de divisiones celulares. Esta observación muestra que el vector viral SeVV-eGFP-PΔ2-77 tiene replicación deficiente del genoma, o sea, que no se sintetiza ningún genoma nuevo. Si varias divisiones celulares consecutivas de una célula infectada conducen a una reducción continua de la intensidad de la fluorescencia, hasta que ésta sucumba finalmente, puede descartarse una amplificación vírica.

Para confirmar finalmente la deficiencia en la replicación de SeVV-eGFP-PΔ2-77 en las células objetivo, se efectuó una última investigación: Se diseñó una botella T75 con - 20 x 10⁶ células Vero. Las células se sembraron en alta densidad ya al inicio de la fase de incubación y dejaron de ser, por consiguiente, muy activas en la división. Estas

células Vero se infectaron con SeVV-eGFP-PA2-77 con un MOI de 0,001. Tras un tiempo de incubación de una hora se efectuó un cambio de medio conforme a la DMEM con un 5% de FKS (para una actividad de división reducida) y se incubaron las células Vero a 33°C (P1). Dos días después pudieron observarse, correspondientemente al MOI seleccionado, inicialmente varios miles de células Vero fluorescentes infectadas situadas individualmente. Debido a la alta densidad celular no se produjo, en los 4 días de incubación siguientes, apenas división celular, es decir, el número de células inicialmente infectadas, detectado mediante la fluorescencia, permaneció constante. Si en este tiempo se hubieran formado partículas víricas, podrían infectarse estas células adyacentes, lo que se hubiera reflejado nuevamente en un aumento de la fluorescencia. También después de 8 días pudo descartarse una propagación del vector viral debido a las nuevas infecciones ausentes de las células circundantes. Para suministrar medio fresco a las células, se redujo el exceso y se recubrieron las células Vero con medio nuevo. 12 días tras el inicio de la incubación se sustituyeron las células Vero de la placa de cultivo. Durante toda la duración del ensayo no pudo observarse ninguna replicación del vector viral en forma de aumento de las células fluorescentes. Pudo descartarse, por tanto, una propagación de SeVV-eGFP-PA2-77 de las células infectadas primariamente a las células Vero circundantes mediante la producción de nuevos genomas y partículas víricas. Por tanto, el SeVV-eGFP-PA2-77 ha de denominarse como vector viral de replicación deficiente.

Resultado

Los resultados indicados anteriormente muestran que, mediante la manipulación selectiva en genes para componentes del complejo de polimerasa, pueden producirse virus de ARN de replicación deficiente de cadena negativa, que sólo sean capaces aún de transcribir los genes codificados por virus, pero no de seguir replicando el genoma vírico.

En el caso del virus Sendai se estudiaron a fondo especialmente dos variantes, en las que o bien se ha suprimido completamente el gen para el co-factor fosfoproteína de la polimerasa ("SeVV-eGFP-ΔP") o se han eliminado los codones para los aminoácidos 2 a 77 ("SeVV-eGFP-PA2-77"). Ambos vectores SeV son de replicación deficiente en las células, que no dispongan de la P proteína *en trans* (llamadas células objetivo), aunque se diferencien considerablemente en su potencia de expresión génica.

Aunque en el caso de SeVV-eGFP-ΔP para un MOI = 5, sólo un 0,7% de las células Vero permanecen estadísticamente sin infectar - un 99,3% debería contener al menos un complejo de RNP - sólo un 0,01% de las células eGFP-positivas pudo examinarse al microscopio. De esto puede concluirse aritméticamente, que sólo se produce una expresión transgénica visible, cuando haya 15 o más RNPs de SeVV-eGFP-ΔP al mismo tiempo en una célula objetivo infectada.

Este SeVV deficiente en gen P muestra una expresión igual de débil que la de variante ΔP análoga de la rabia - (Shoji *et al.*, *supra*). Ambos vectores sólo son capaces, en la célula objetivo infectada, de la transcripción primaria a través del complejo de polimerasa llevado desde la partícula vírica. Para una aplicación terapéutica del vector, resulta sin embargo deseable una expresión más fuerte del transgénico codificado y/o antígeno. Esta condición puede cumplirse con ayuda de la variante SeVV-eGFP-PA2-77 de replicación deficiente, que produce una potencia de expresión en las células objetivo sólo reducida en torno al factor medio 10 en comparación con el SeV competente en la replicación. Mediante la presencia del gen para una proteína P acortada N-terminalmente en el genoma vectorial no sólo es posible una transcripción primaria, sino también una transcripción secundaria. Esta se efectúa mediante complejos de polimerasa modificados nuevamente producidos, que contengan la proteína PA2-77 codificada por el vector; ésta no soporta, sin embargo, el modo de replicación de la polimerasa.

Mediante la cuantificación de la síntesis de proteínas en las células objetivo infectadas se comprueba, que el vector viral de replicación deficiente SeVV-eGFP-PA2-77 es capaz de llevar a cabo una transcripción eficiente y expresión viral de los genes codificados. Además, no sólo el transgénico 3'-proximal (eGFP) se sintetiza efectivamente; también el gen HN situado en la posición genómica 6 se transcribe durante al menos 9 días tras la infección y la proteína se expone funcionalmente a las células objetivo infectadas.

9. Determinación de la Respuesta Inmunológica Inducida por una Vacuna de ARN de Replicación Deficiente en un Modelo de Ratón

Pudo demostrarse, que un complejo de polimerasa viral modificado, que no permite ya ningún síntesis de nuevos genomas, se produce preferentemente mediante una supresión en el gen P ("PA2-77"). Tras la infección con este virus de replicación deficiente, la expresión viral génica obtenida en la célula objetivo es, al mismo tiempo, sólo aprox. 10 veces menor en comparación con las infecciones con virus competentes en la replicación.

Para comprobar una propiedad suficientemente inmunogénica del virus de ARN de replicación deficiente de cadena negativa como vector de vacunación, se emplearon antígenos y/o determinantes antígenos de dos virus heterólogos (virus parainfluenza humano tipo 3, hPIV3, y virus sincitial respiratorio, RSV) en el genoma vírico: Para ello se contruyó un SeV PA2-77 de replicación deficiente, en el que los genes de las proteínas superficiales F y HN iniciales se sustituyen por genes, que codifiquen SeV/hPIV3 para las proteínas quiméricas F y HN. La proteína F quimérica contiene 558 aminoácidos y consiste en el dominio extracelular de hPIV3 (493 aminoácidos), el dominio transmembranario de SeV (23 aminoácidos) y el dominio citoplasmático de SeV (42 aminoácidos). La proteína HN quimérica contiene 579 aminoácidos y consiste en el dominio citoplasmático de SeV (35 aminoácidos), el dominio transmembranario de SeV (25 aminoácidos), así como el dominio extracelular de hPIV3 (519 aminoácidos). Las secuencias de aminoácidos

de la proteína F quimérica y de la proteína HN quimérica se muestran en el protocolo de secuencias como SEQ ID N° 27 y 28.

Mediante la inserción de genes quiméricos en el genoma vírico se genera nueva antigenidad y se garantiza al mismo tiempo el ensamblaje eficiente de las partículas de la vacuna durante su producción.

En un casete de expresión adicional insertado entre dos genes virales se efectuó la codificación de la proteína superficial F del RSV, extendiéndose la construcción a una vacuna bivalente.

Esta nueva vacuna se examinó en un modelo animal. Se inmunizaron grupos de ratones Balb/C intranasalmente tres veces en el intervalo de tres semanas con dos preparaciones de virus diferentes (grupo A y/o C, cada uno 10^4 unidades infecciosas), un grupo de control (B) recibió PBS en vez de la vacuna. Tras la tercera inmunización se obtuvieron líquidos de lavado (NW) nasales para el análisis de la respuesta inmunológica mucosal y se efectuaron lavados broncoalveolares (BAL) y se aisló el serum para el análisis de la respuesta inmunológica humoral. A través de la técnica ELISA se determinó la cantidad de inmunoglobulinas IgA e IgG inducidas específicamente contra hPIV3, así como RSV. El prototipo de vacuna de replicación deficiente produjo una clara inducción de anticuerpos IgA específicamente contra hPIV3 (Fig. 15A), la inducción de anticuerpos IgA anti-RSV resultó baja (no mostrada). La inducción de una respuesta inmunológica humoral contra los antígenos superficiales de ambos virus produjo títulos comparables, la cantidad de IgG específico se distingue en torno al factor 2 (Fig. 15B). Un análisis continuo del IgG anti-hPIV3 mostró, que los anticuerpos inducidos tienen propiedades neutralizantes (título 1/64). En contraste con esto, - tal y como se esperaba - en el grupo de control no pudo comprobarse ninguna inducción específica de IgA y/o IgG.

La vacuna conforme a la invención podía inducir una respuesta inmunológica mucosal y humoral específica frente a los antígenos virales heterólogos. Otros experimentos muestran, que los linfocitos de ratones inmunes produjeron interferona- γ , mientras que el IL-5 no podía comprobarse. Este resultado indica que la vacuna de ARN bivalente, de replicación deficiente es capaz de activar una respuesta inmunológica de las células T, que es una condición para una inmunidad largamente persistente.

Resultado

Tras la infección de animales de cría con un vector modificado, en el que se han empleado secuencias codificadoras de antígenos de dos virus heterólogos, se demostró la inducción de anticuerpos neutralizantes. Esto muestra el potencial de los virus de ARN de replicación deficiente de cadena negativa para el desarrollo de nuevas vacunas.

10. Lista de los Oligonucleótidos de ADN Empleados

Los oligonucleótidos de ADN empleados en los ejemplos indicados anteriormente se muestran en la siguiente Tabla 3.

TABLA 3

SEC ID N°	Designación	Longitud [nt]	Secuencia 5'→3'	Tm [°C]
1	XI=M13	19	GGAAACAGCTATGACCATG	54
2	XI (+)	59	GGATCATTAGTACCTTGAAGCCTCGTAGATCGC GGCCGCGTGAACCTTTGGCAGCAAAG	58
3	XII	57	GGCTTCAAGGTACTAATGATCCGTAGTAAGAAA AACTTAGGGTGAAAGTATTCCACC	64
4	XII(+) (+) = N-1029(+)	18	GGTAGGTGTCTATGAGGC	56
5	XX	44	GGAAGGAAAAGCGGCCGCCGGCGGGATCATA CGAGGCTTCAAGG	61
6	XX (+)	57	CCTGTGTTTCTGCGGCCGCCGTTTCGCGAGGCC GGCCCGTGAACCTTTGGCAGCAAAGC ..	61

ES 2 321 651 T3

7	<i>NotI</i> eGFP	44	CGCGGGGCCCGGGCGGCCGCGTCGCCACCAT GGTGAGCAAGGGC	60
8	eGFP <i>NotI</i> (+)	26	GATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTTAC	58
9	<i>SgrAI</i> eGFP	36	GGATTACTATCGCCGGCGGTCGCCACCATGGT GAGC	61
10	eGFP <i>SgrAI</i> (+)	37	CGCTAACTGTCGCCGGCGTTTACTTGTACAGCT CGTCC	63
11	<i>FseI</i> DsRed	36	CGGATCAAGTGGCCGGCGTCGCCACCATGGT GCGC	59
12	DsRed <i>FseI</i> (+)	42	CGCGAATATCGGCCGGCCAAGTCTACAGGAAC AGGTGGTGGC	63
17	ΔP I = N- 578	17	CCCTGACACACTCCTTC	54
18	ΔP I (+)	31	GCGCCGCTCGAGGCGGTAAGTGTAGCCGAAG	64
19	ΔP II	34	CCTGCGCTCGAGCTCATCCCGGGTGAGGCATC CC	64
20	ΔP II(+)	34	GGCGACGCGTCAGTCTCACAGCCTAATTCTG	64
21	<i>XhoI</i> P Δ 2- 77	47	CCCCCTTTTCTCGAGATGTGACCCAAGATAA TCGATCAGGTGAGG	84
22	P Δ 2-77 (+) <i>XhoI</i>	46	TTTTTCCCCCTCGAGTTACTAGTTGGTCAGTG ACTCTATGTCCTC	80

REIVINDICACIONES

1. Virus de ARN de cadena negativa recombinante, conteniendo un genoma viral con una mutación en el gen P,
5 que conlleva la pérdida de la replicabilidad sin pérdida de la capacidad de transcripción secundaria.
2. Virus conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** por ser un paramyxovirus.
3. Virus conforme a la Reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** por ser un virus Sendai.
- 10 4. Virus conforme a la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la mutación se relaciona con la secuencia parcial N-terminal de la proteína codificada por el gen P.
5. Virus conforme a la Reivindicación 4, **caracterizado** porque la mutación comprende: una supresión de
15 (a) los aminoácidos 2-77 de la proteína codificada por el gen P ó
(b) una secuencia parcial de (a) suficiente para la pérdida de la replicabilidad.
- 20 6. Virus según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el genoma viral contiene al menos una secuencia codificadora de un producto génico heterólogo.
7. Virus conforme a la Reivindicación 6, **caracterizado** porque el producto génico heterólogo es una proteína, una ribozima, una molécula antisentido o una molécula de ARNsi.
- 25 8. Virus conforme a la Reivindicación 6 ó 7, **caracterizado** porque el producto génico heterólogo es una proteína reportera, un antígeno o una proteína terapéutica.
9. Virus según al menos una de las Reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado** porque el producto génico heterólogo es
30 un antígeno de un patógeno heterólogo, seleccionado entre virus, bacterias y protozoos.
10. Virus según al menos una de las Reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado** porque el producto génico heterólogo es un antígeno viral.
- 35 11. Virus conforme a la Reivindicación 10, **caracterizado** porque el genoma viral codifica varios antígenos heterólogos derivados del mismo o diferentes virus.
12. Virus según al menos una de las Reivindicaciones 6 a 11, **caracterizado** porque la secuencia codificadora se inserta en el genoma viral para al menos un producto génico heterólogo o/y sustituye secuencias codificadoras para un
40 producto génico homólogo.
13. Virus según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque el virus presenta, en comparación con el tipo salvaje, una capacidad de transcripción reducida en torno a, a lo sumo, un factor 20.
- 45 14. Nucleocápside de un virus de ARN de cadena negativa según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13.
15. Genoma de un virus de ARN de cadena negativa según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13.
16. Molécula de ADN, que codifica el genoma o/y antigenoma de un virus de ARN de cadena negativa recombinante según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13.
- 50 17. Molécula de ADN conforme a la Reivindicación 16, **caracterizado** porque está operacionalmente enlazada con una señal de transcripción.
18. Molécula de ADN conforme a la Reivindicación 17, **caracterizado** porque la señal de transcripción es un
55 promotor de bacteriófago, por ejemplo, un promotor T7 ó SP6.
19. Célula, conteniendo un virus según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13, un nucleocápside conforme a la Reivindicación 14, un genoma conforme a la Reivindicación 15 ó una molécula de ADN según al menos una de las
60 Reivindicaciones 16 a 18.
20. Célula conforme a la Reivindicación 19, **caracterizada** por ser una célula de amplificación de vectores.
21. Célula conforme a la Reivindicación 19, **caracterizada** por ser una célula de producción de virus.
- 65 22. Célula conforme a la Reivindicación 21, **caracterizada** por contener además una molécula de ADN codificadora de una ARN-polimerasa heteróloga dependiente del ADN, que provoque la transcripción de la molécula de ADN codificadora del virus de ARN de cadena negativa recombinante.

23. Célula conforme a la Reivindicación 19, **caracterizada** por ser una célula de amplificación de virus.

24. Célula según al menos una de las Reivindicaciones 19 a 23, **caracterizada** por contener además moléculas de ADN codificadoras de la proteína P viral.

25. Procedimiento para la producción de un virus de ARN de cadena negativa según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo los pasos:

(a) suministro de una célula, transfectada con una molécula de ADN, que codifique el genoma de un virus de ARN de cadena negativa, conteniendo una mutación en el gen P, que conlleve la pérdida de la replicabilidad del genoma viral sin pérdida de la capacidad de transcripción secundaria, y, si fuera necesario, al menos una secuencia codificadora de un producto génico heterólogo, y

(b) cultivo de la célula en unas condiciones, en las que se lleve a cabo una transcripción del ADN conforme a (a) y se produzca el virus de ARN de cadena negativa recombinante.

26. Procedimiento conforme a la Reivindicación 25, comprendiendo además la recuperación del nucleocápside o del genoma viral del virus de ARN de cadena negativa.

27. Procedimiento para la amplificación de un virus de ARN de cadena negativa según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13, comprendiendo los pasos:

(a) suministro de una célula, infectada con un virus de ARN de cadena negativa, conteniendo una mutación en el gen P, que conlleve la pérdida de la replicabilidad del genoma viral sin pérdida de la capacidad de transcripción secundaria, y si fuera necesario, al menos una secuencia codificadora de un producto génico heterólogo, y

(b) cultivo de la célula en unas condiciones, en las que se lleve a cabo una amplificación del virus.

28. Composición farmacéutica, **caracterizada** por contener un virus de ARN de cadena negativa recombinante según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13, un nucleocápside conforme a la Reivindicación 14 ó un genoma viral conforme a la Reivindicación 15, como principio activo, así como, si fuera necesario, materiales de soporte o/y auxiliares farmacéuticamente habituales.

29. Composición farmacéutica conforme a la Reivindicación 28 para el empleo como vacuna.

30. Composición farmacéutica conforme a la Reivindicación 29 como vacuna mono- o polivalente.

31. Composición farmacéutica conforme a la Reivindicación 29 ó 30 como vacuna contra las infecciones virales, por ejemplo, como vacuna contra las infecciones con virus de ARN de cadena negativa patógenos.

32. Composición farmacéutica conforme a la Reivindicación 28 para el empleo para la terapia anti-tumoral.

33. Composición farmacéutica según al menos una de las Reivindicaciones 28 a 32 para el empleo en pacientes de riesgo.

34. Composición farmacéutica según al menos una de las Reivindicaciones 28 a 33, comprendiendo el nucleocápside en la envoltura viral nativa.

35. Empleo de una célula, que produzca constitutivamente o de manera inductible la proteína P de un virus de ARN de cadena negativa, de manera estable, para la producción o amplificación de virus de ARN de cadena negativa recombinantes según al menos una de las Reivindicaciones 1 a 13, de nucleocápsides conformes a la Reivindicación 14 o de genomas virales conformes a la Reivindicación 15.

36. Empleo conforme a la Reivindicación 35, **caracterizado** porque la célula es una célula mamaria.

37. Empleo conforme a la Reivindicación 35 ó 36, **caracterizado** porque la célula se selecciona entre la célula H29 (DSM ACC2702) o una célula derivada de ésta.

Figura 1

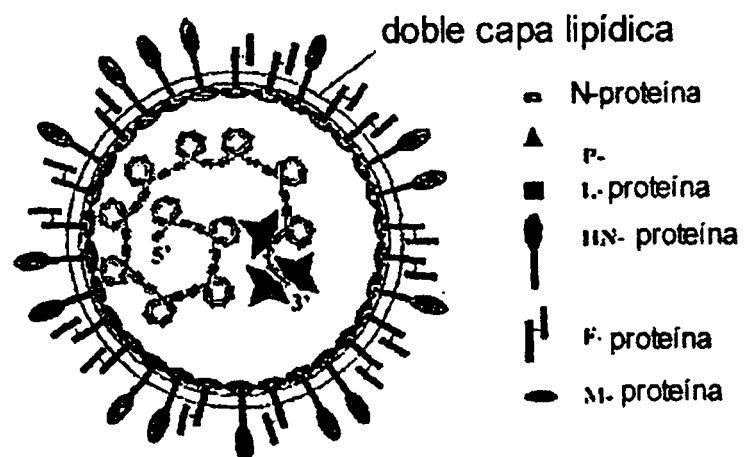


Figura 2

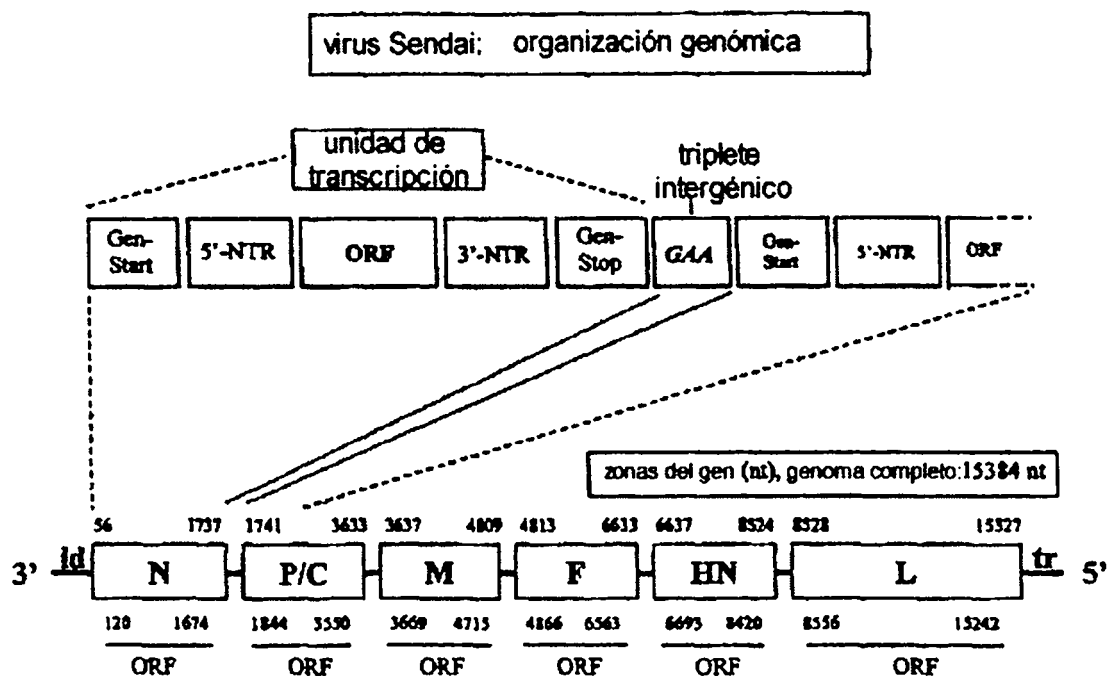


Figura 3

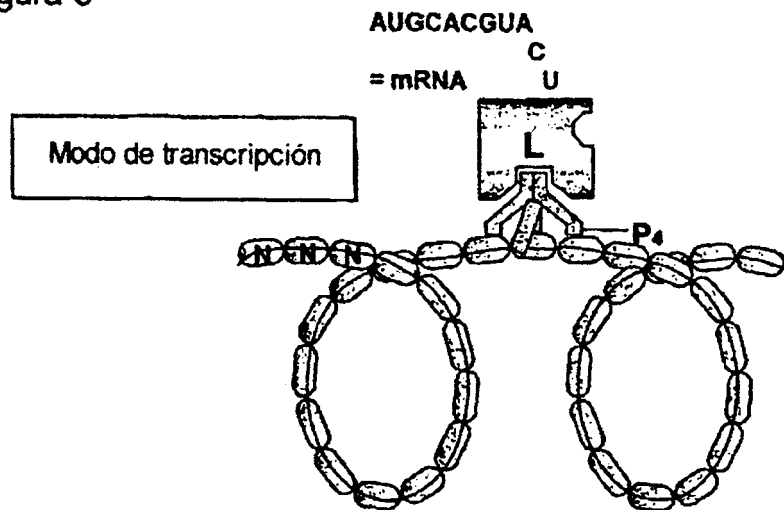


Figura 4

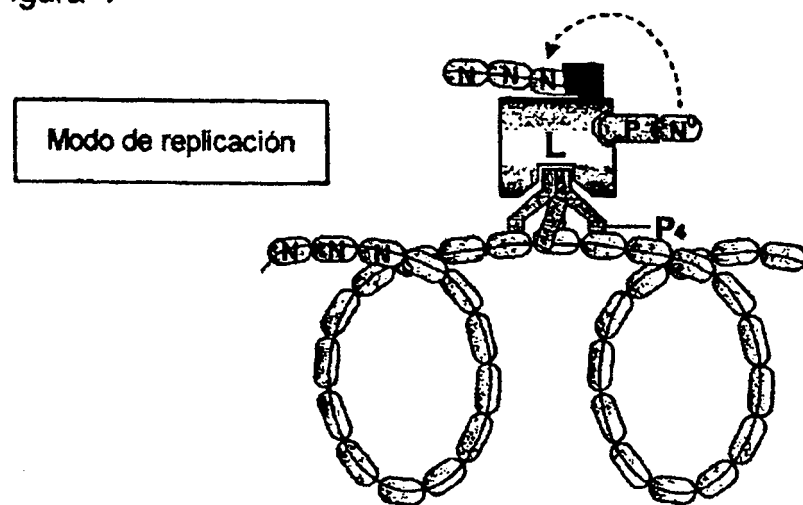


Figura 5

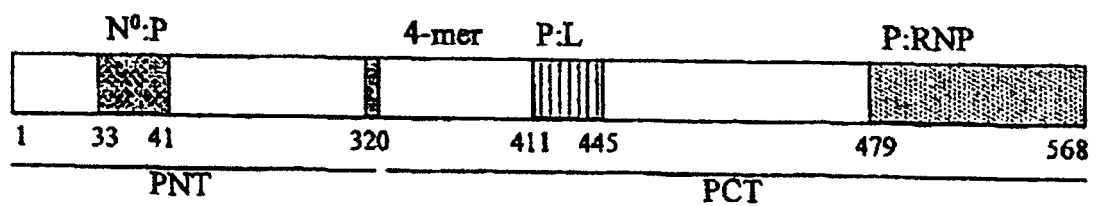


Figura 6

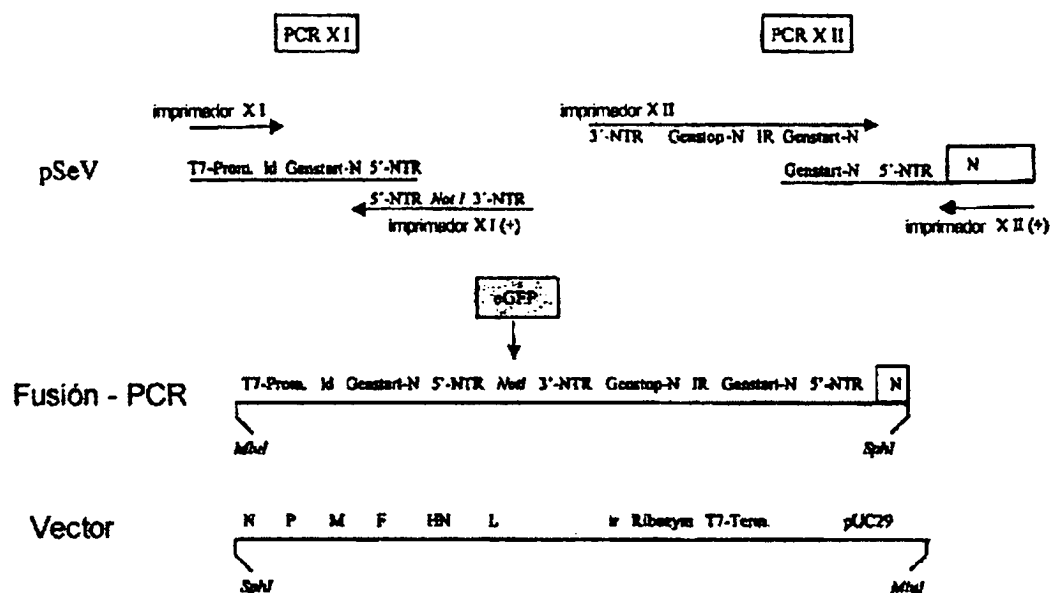


Figura 7

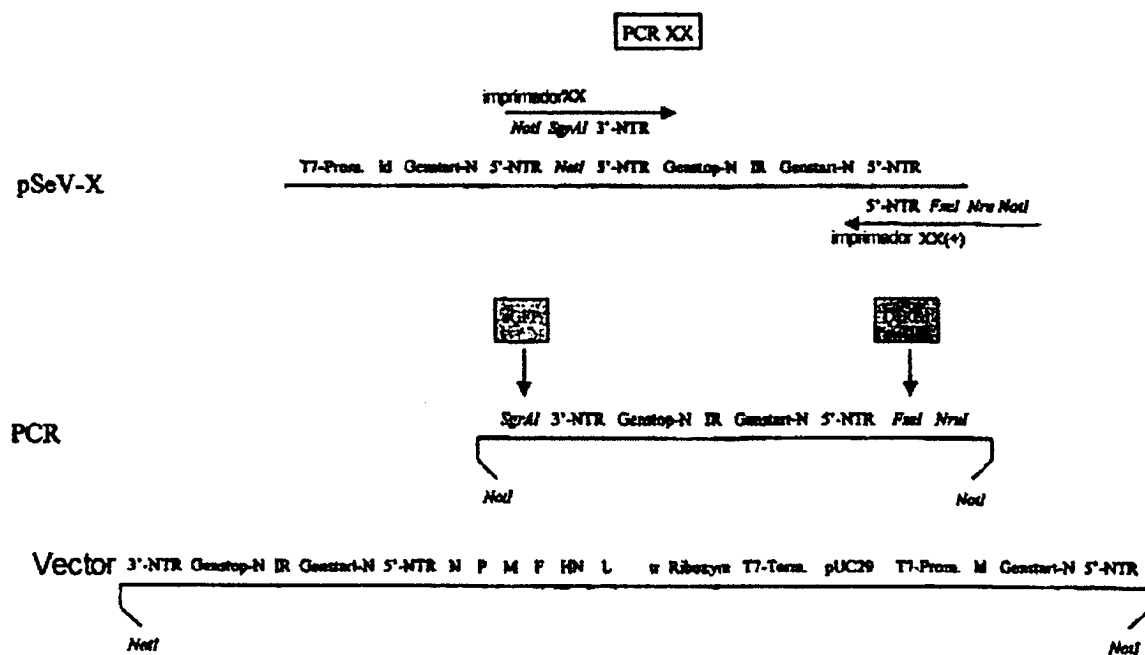


Figura 8

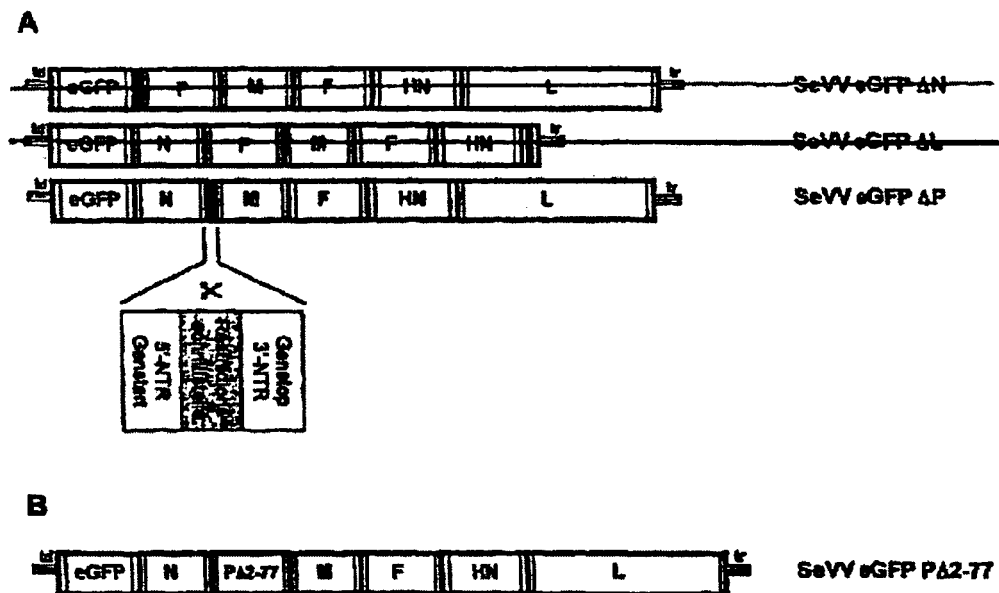


Figura 9

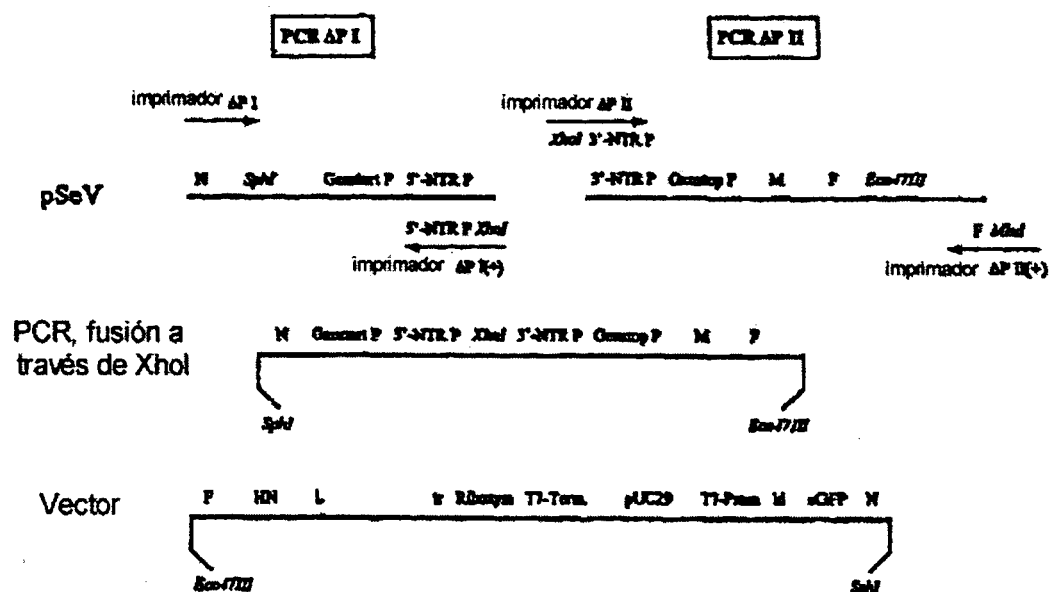


Figura 10

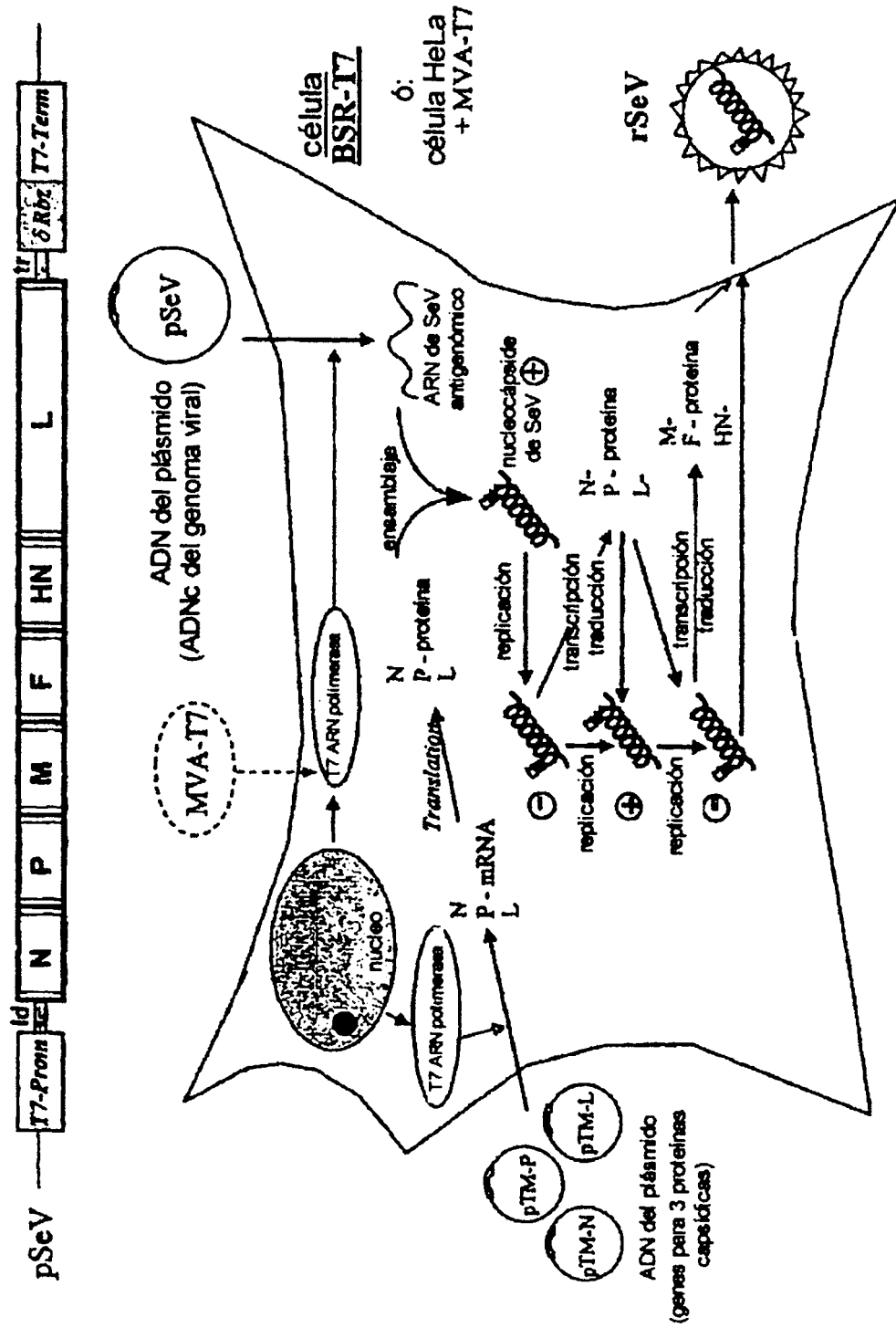


Figura 11

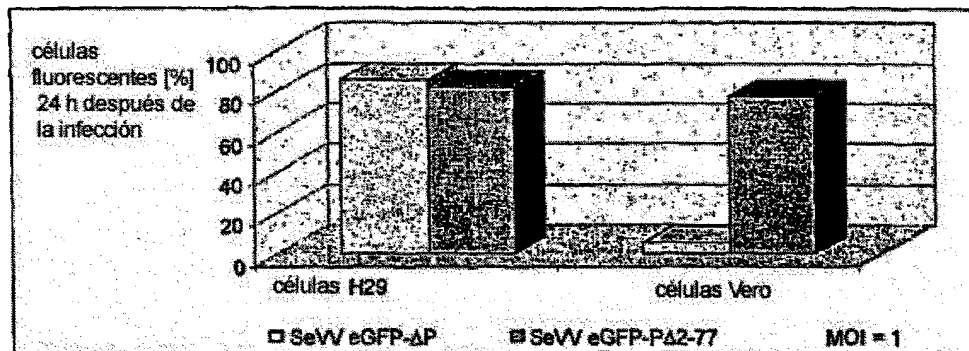


Figura 12

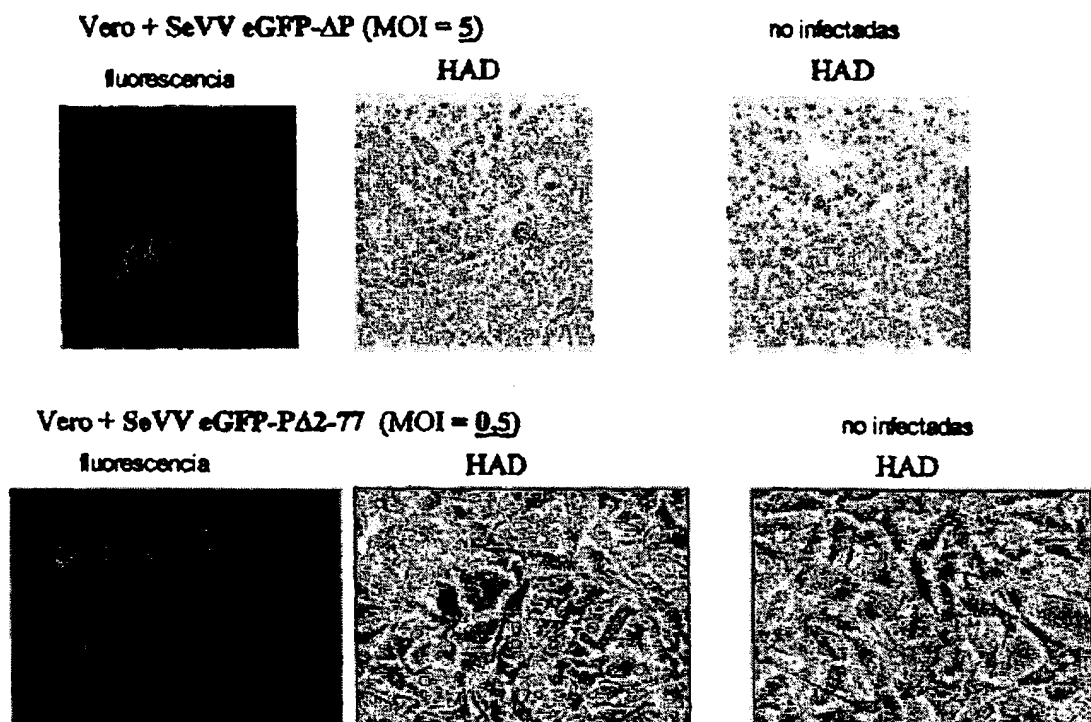


Figura 13

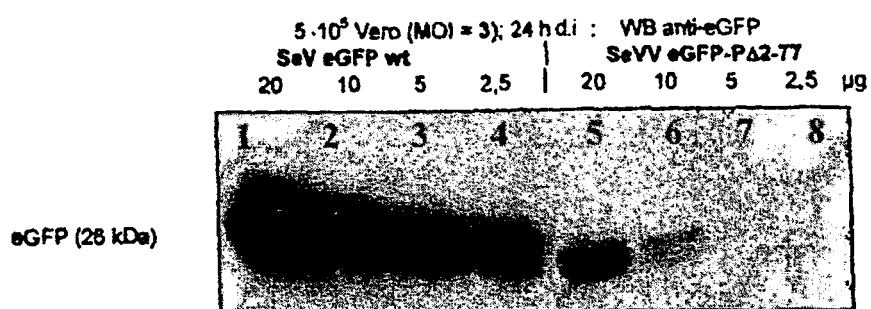


Figura 14

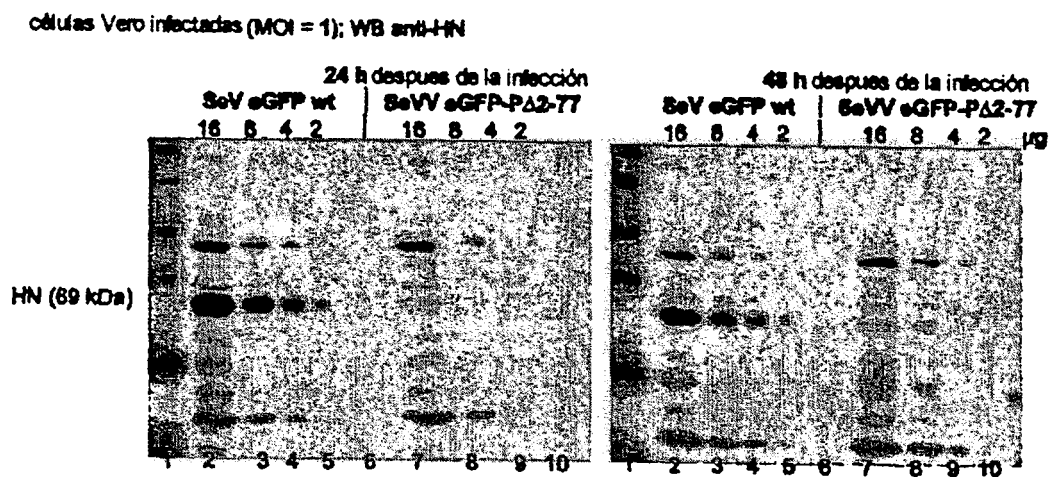
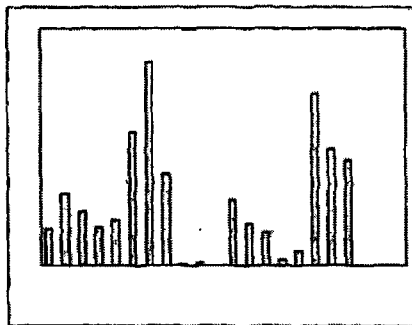
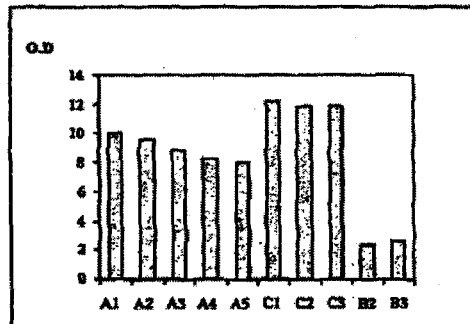


Figura 15

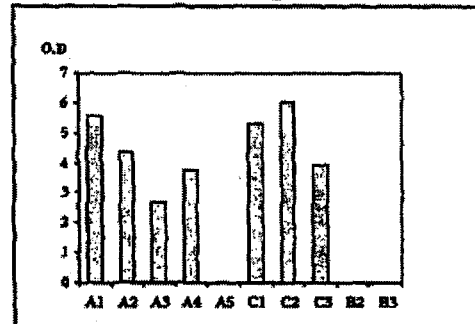
15 A anti hPIV3 IgA (ng/ml)



15 B anti-hPIV3 IgG



anti-RSV IgG



ES 2 321 651 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Sociedad Max Planck para el Avance de la Ciencia	
5	<120> virus de ARN de replicación deficiente como vacunas	
	<130> 33778P WO	
10	<150> DE102005006388.8	
	<151> 2005-02-11	
	<160> 28	
15	<170> versión 3.3 del solicitante de la patente	
	<210> 1	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> oligonucleótido	
	<400> 1	
30	ggaaacagct atgaccatg	19
	<210> 2	
	<211> 58	
35	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> oligonucleótido	
	<400> 2	
45	ggatcattag tacctgaag cctcgtagat cgcggccgcg tgaacttgg cagcaaag	58
	<210> 3	
	<211> 57	
50	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> oligonucleótido	
	<400> 3	
60	ggttcaagg tactaatgat ccgtagtaag aaaaacttag ggtgaaagta ttccacc	57
	<210> 4	
65	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	

ES 2 321 651 T3

	<220>		
	<223> oligonucleótido		
5	<400> 4		
	ggtaggtgtc tatgaggc		18
10	<210> 5		
	<211> 44		
	<212> ADN <213> secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 5		
20	ggaaggaaaa gcggccgccg gcgggatcat acgaggcttc aagg		44
	<210> 6		
25	<211> 57		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 6		
35	cctgtgtttc tgcggccgcc gttcgcgagg ccggcccgatg aactttggca gcaaagc		57
	<210> 7		
40	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
45	<400> 7		
	cgcgggcccg gggcgggccgc gtcgccacca tggtagcaa gggc		44
50	<210> 8		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> oligonucleótido		
60	<400> 8		
	gatgcatgct cgagcgcccg ctttac		26
65	<210> 9		
	<211> 36		
	<212> ADN		

ES 2 321 651 T3

	<213> secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> oligonucleótido	
	<400> 9	
10	ggattactat cgccggcggt cgccaccatg gtgagc	36
	<210> 10	
	<211> 38	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> oligonucleótido	
	<400> 10	
25	cgctaactgt cgccggcggt tacttgtaca gctcgtcc	38
	<210> 11	
	<211> 36	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> oligonucleótido	
	<400> 11	
40	cggatcaagt ggccggccgt cgccaccatg gtgcgc	36
	<210> 12	
	<211> 42	
45	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> oligonucleótido	
	<400> 12	
55	cgcgaatatt ggccggccaa gtctacagga acagtggtg gc	42
	<210> 17	
	<211> 17	
60	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> oligonucleótido	

ES 2 321 651 T3

	<400> 17	
	ccctgacaca ctccttc	17
5	<210> 18	
	<211> 31	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
15	<400> 18	
	gcgccgctcg aggcggtag ttagccgaa g	31
20	<210> 19	
	<211> 34	
	<212> ADN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
30	<400> 19	
	cctgcgctcg agctcatccc gggtgaggca tccc	34
35	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
45	<400> 20	
	ggcgacgcgt cagtctcaca gcctaattcg	30
50	<210> 21	
	<211> 47	
	<212> ADN	
55	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
60	<400> 21	
	ccccctttt ctcgagatgt cgaccaaga taatcgatca ggtgagg	47
65	<210> 22	
	<211> 46	

ES 2 321 651 T3

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 22

10

ttttccccc ctcgagttac tagttgggtca gtgactctat gtcctc

46

<210> 27

15 <211> 558

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> proteína quimérica

<400> 27

25

Met Pro Thr Ser Ile Leu Leu Ile Ile Thr Thr Met Ile Met Ala Ser
1 5 10 15

30

Phe Cys Gln Ile Asp Ile Thr Lys Leu Gln His Val Gly Val Leu Val
20 25 30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 321 651 T3

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

ES 2 321 651 T3

	Asp	Tyr	Ser	Ile	Thr	Leu	Gln	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Leu	
			275					280					285				
5	Leu	Asn	Thr	Gln	Ile	Tyr	Arg	Val	Asp	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ile	Gln	
		290					295					300					
10	Asn	Arg	Glu	Trp	Tyr	Ile	Pro	Leu	Pro	Ser	His	Ile	Met	Thr	Lys	Gly	
	305					310					315					320	
15	Ala	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Asp	Val	Lys	Glu	Cys	Ile	Glu	Ala	Phe	Ser	
					325					330					335		
20	Ser	Tyr	Ile	Cys	Pro	Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Val	Leu	Asn	His	Glu	Met	
				340					345					350			
25	Glu	Ser	Cys	Leu	Ser	Gly	Asn	Ile	Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Thr	Val	Val	
			355					360					365				
30	Lys	Ser	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Val	
		370					375					380					
35	Ala	Asn	Cys	Ile	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Asn	Arg	
	385					390					395					400	
40	Ile	Asn	Gln	Pro	Pro	Asp	Gln	Gly	Val	Lys	Ile	Ile	Thr	His	Lys	Glu	
				405						410					415		
45	Cys	Asn	Thr	Ile	Gly	Ile	Asn	Gly	Met	Leu	Phe	Asn	Thr	Asn	Lys	Glu	
				420					425					430			
50	Gly	Thr	Leu	Ala	Phe	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asp	Ile	Thr	Leu	Asn	Asn	Ser	
			435					440					445				
55	Val	Ala	Leu	Asp	Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Ile	Glu	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys	
		450					455					460					
60	Ser	Asp	Leu	Glu	Glu	Ser	Lys	Glu	Trp	Ile	Arg	Arg	Ser	Asn	Gln	Lys	
	465					470					475					480	
65	Leu	Asp	Ser	Ile	Gly	Asn	Trp	His	Gln	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Ile	Thr	
				485						490					495		

ES 2 321 651 T3

Ile Ile Val Val Met Val Val Ile Leu Val Val Ile Ile Val Ile Val
500 505 510

5 Ile Val Leu Tyr Arg Leu Lys Arg Ser Met Leu Met Gly Asn Pro Asp
515 520 525

10 Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr Leu Glu Pro Lys Ile Arg His
530 535 540

15 Met Tyr Thr Asn Gly Gly Phe Asp Ala Met Ala Glu Lys Arg
545 550 555

<210> 28
<211> 579
20 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
25 <223> proteína quimérica

<400> 28

30 Met Asp Gly Asp Arg Gly Lys Arg Asp Ser Tyr Trp Ser Thr Ser Pro
1 5 10 15

Ser Gly Ser Thr Thr Lys Leu Ala Ser Gly Trp Glu Arg Ser Ser Lys
20 25 30

35 Val Asp Thr Trp Leu Leu Ile Leu Ser Phe Thr Gln Trp Ala Leu Ser
35 40 45

40 Ile Ala Thr Val Ile Ile Cys Ile Ile Ile Ser Ala Asn Ser Ile Lys
50 55 60

45 Ser Glu Lys Ala His Glu Ser Leu Leu Gln Asp Val Asn Asn Glu Phe
65 70 75 80

50 Met Glu Val Thr Glu Lys Ile Gln Met Ala Ser Asp Asn Ile Asn Asp
85 90 95

55 Leu Ile Gln Ser Gly Val Asn Thr Arg Leu Leu Thr Ile Gln Ser His
100 105 110

60 Val Gln Asn Tyr Ile Pro Ile Ser Leu Thr Gln Gln Met Ser Asp Leu
115 120 125

ES 2 321 651 T3

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

ES 2 321 651 T3

Glu Asn Ala Ile Cys Asn Thr Thr Gly Cys Pro Gly Lys Thr Gln Arg
 355 360 365
 5 Asp Cys Asn Gln Ala Ser His Ser Pro Trp Phe Ser Asp Arg Arg Met
 370 375 380
 10 Val Asn Ser Ile Ile Val Val Asp Lys Gly Leu Asn Ser Ile Pro Lys
 385 390 395 400
 15 Leu Lys Val Trp Thr Ile Ser Met Arg Gln Asn Tyr Trp Gly Ser Glu
 405 410 415
 20 Gly Arg Leu Leu Leu Leu Gly Asn Lys Ile Tyr Ile Tyr Thr Arg Ser
 420 425 430
 25 Thr Ser Trp His Ser Lys Leu Gln Leu Gly Ile Ile Asp Ile Thr Asp
 435 440 445
 30 Tyr Ser Asp Ile Arg Ile Lys Trp Thr Trp His Asn Val Leu Ser Arg
 450 455 460
 35 Pro Gly Asn Asn Glu Cys Pro Trp Gly His Ser Cys Pro Asp Gly Cys
 465 470 475 480
 40 Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Ala Tyr Pro Leu Asn Pro Thr Gly Ser
 485 490 495
 45 Ile Val Ser Ser Val Ile Leu Asp Ser Gln Lys Ser Arg Val Asn Pro
 500 505 510
 50 Val Ile Thr Tyr Ser Thr Ser Thr Glu Arg Val Asn Glu Leu Ala Ile
 515 520 525
 55 Arg Asn Lys Thr Leu Ser Ala Gly Tyr Thr Thr Thr Ser Cys Ile Thr
 530 535 540
 60 His Tyr Asn Lys Gly Tyr Cys Phe His Ile Val Glu Ile Asn His Lys
 545 550 555 560
 65 Ser Leu Asp Thr Phe Gln Pro Met Leu Phe Lys Thr Glu Ile Pro Lys
 565 570 575
 Ser Cys Ser