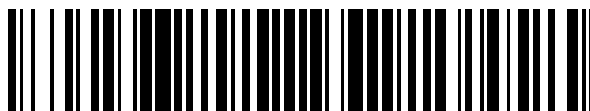


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 518**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/115** (2006.01)

**C07K 14/12** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2006 E 06292025 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1939214**

54 Título: **Células y metodología para generar virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.09.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (50.0%)  
25-28, rue du Docteur Roux  
75724 Paris Cedex 15, FR y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TANGY, FRÉDÉRIC;  
CHARNEAU, PIERRE y  
JACOB, YVES**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 423 518 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Células y metodología para generar virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada

5 La presente invención se refiere a células recombinantes así como también a métodos para la generación de virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada (NNV o mononegavirales) a partir de ácido desoxirribonucleico clonado (ADNc), especialmente a partir del virus de sarampión y en particular a partir de cepas atenuadas tales como las aprobadas para la vacunación, en particular a partir del virus de sarampión atenuado Schwarz y varios virus en base a sarampión Schwarz recombinantes que expresan secuencias heterólogas. Tales virus de rescate pueden utilizarse, después de la amplificación, como vacunas para inmunización en contra de sarampión y/o en contra de péptidos heterólogos o proteínas expresadas.

15 Los virus de ARN atenuados vivos hacen vacunas muy eficaces. Entre éstas, la vacuna de sarampión se ha utilizado en cientos de millones de niños y se ha probado que es eficaz y segura. Esta vacuna induce inmunidad de por vida después de una o dos inyecciones. La misma se produce fácilmente a gran escala a bajos precios en la mayoría de los países. Estas ventajas hacen al virus de sarampión, especialmente cepas de vacuna atenuadas, un buen vector candidato para inmunizar niños pero incluso en algunas circunstancias las poblaciones adultas, frente a sarampión y/o patologías infecciosas, especialmente patologías virales tales como SIDA (retrovirus), enfermedades de flavivirus o coronavirus (SARS).

20 Los virus de sarampión atenuados se han utilizado como vacunas desde la década de 1960 puesto que es una de las vacunas humanas más eficaces y seguras. Las campañas de vacunación han sido muy eficaces para controlar el sarampión en los países desarrollados. Sin embargo, debido a la distribución inadecuada de la vacuna en los países en desarrollo, el sarampión aún infecta a aproximadamente 45 millones de individuos y es responsable de la muerte de 700.000 niños por año. Por lo tanto, la OMS ha incrementado su programa de vacunación global para los próximos 10-20 años (C.D.C., 2005). Tomando ventaja de las campañas de la OMS, el uso de vectores de vacuna obtenidos a partir de vacuna de sarampión permitirán en algunas regiones del mundo la inmunización simultánea de niños frente a sarampión y otras enfermedades infecciosas con nuevas vacunas pediátricas multivalentes, especialmente bivalentes que son tanto seguras como eficaces.

30 El virus de sarampión (MV) pertenece al género *Morbillivirus* en la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus con envuelta con un genoma de ARN de cadena de polaridad negativa no segmentada (15.894 pb). El sarampión puede contraerse una vez que el sistema inmune muestra una fuerte respuesta específica y establece una memoria de por vida que protege frente a re-infección. Esta protección se basa tanto en la producción de anticuerpos como de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos de memoria (CTL). Las cepas patógenas alteran de forma marcada la hematopoyesis (Arneborn y col., 1983; Kim y col., 2002; Okada y col., 2000) dando como resultado, por tanto, inmunosupresión transitoria responsable de la mayoría de las muertes debido a infección por sarampión en los países en desarrollo. Al contrario de las cepas primarias, las cepas atenuadas no inducen la inmunosupresión (Okada y col., 2001).

40 La cepa Edmonston de virus de sarampión fue aislada en 1954 mediante cultivo en células primarias humanas (Enders y col., 1954). La adaptación a fibroblastos embrionarios de pollo produjo semillas de vacuna que se atenuaron adicionalmente mediante pases posteriores en fibroblastos embrionarios de pollo (Schwarz y col., 1962). Las cepas Schwarz y Moraten que poseen secuencias de nucleótidos idénticas (Park y col., 2001a; Parks y col., 2001b) constituyen la vacuna de sarampión más frecuentemente usada. La vacunación con una o más inyecciones induce la inmunidad de por vida (Griffin y col., 2001; Hilleman y col., 2002). La persistencia de células CD8 y anticuerpos se ha demostrado hasta 25 años después de la vacunación (Ovsyannikova y col., 2003). La vacuna contra el sarampión se produce fácilmente a gran escala en la mayoría de los países y puede estar disponible a bajo coste. La atenuación del genoma viral se produce como resultado de una combinación ventajosa de varias mutaciones. Por tanto, la vacuna es muy estable y la reversión de las cepas de vacuna no se ha observado nunca hasta ahora (Hilleman y col., 2002). Además, el virus se replica solamente en el citoplasma, eliminando cualquier riesgo de integración en los cromosomas del hospedador. Estas características hacen de las vacunas de sarampión atenuadas vivas un excelente candidato para el desarrollo de un vector de vacuna multivalente. Con este fin, se ha clonado un ADNc infeccioso que corresponde al antigenoma de cepa de MV Edmonston B y se estableció una técnica de genética inversa que posibilita la producción del virus correspondiente (Radecke y col., 55 1995).

60 Los inventores han desarrollado previamente un vector utilizando Schwarz MV, la vacuna de sarampión más comúnmente utilizada en el mundo (Combedet y col., 2003). Este vector puede expresar una variedad de genes o combinación de genes grandes para más de 12 pasajes. Se produjeron vectores MV recombinantes que contienen 4.000-5.000 nucleótidos adicionales, que representan un 30% adicional del genoma. Estos virus se produjeron en cultivo celular en títulos comparables con MV convencional. Después de 12 pasajes y un factor amplificador de 10<sup>20</sup>, más del 96% de las células infectadas continúan expresando los genes adicionales. Esta expresión notablemente estable, observada también para otros miembros de *Mononegavirales* (Schnell y col., 1996) se debe probablemente a la ausencia de limitaciones geométricas en el tamaño del genoma por estos virus de nucleocápside helicoidal, al contrario de los virus con cápsides icosaédricas. Además, MV infecta células del sistema inmune (macrófagos y células dendríticas), suministrando de esta manera los antígenos de carga directamente a las células presentadoras

de antígeno más eficaces, una ventaja principal para un vector de vacuna. Finalmente, el genoma de MV es pequeño, evitando de esta manera la respuesta al vector que abruma la respuesta a transgénese.

5 En base a la suposición de que la seguridad y eficacia de una cepa atenuada depende en última instancia de su  
 secuencia del genoma, los inventores han clonado el ADNc infeccioso que corresponde al antigenoma del virus de  
 sarampión Schwarz/Moraten a partir de partículas de virus purificadas a partir de una preparación industrial de la  
 vacuna Schwarz con procedimientos óptimos para mantener la fidelidad (Combredet y col., 2003). Para optimizar el  
 rendimiento del sistema de genética inversa, el ADNc viral antigenómico se colocó bajo el control del promotor de  
 10 ARN polimerasa de fago T7 con un motivo GGG adicional requerido para eficacia óptima. Para permitir la escisión  
 exacta del ARN viral, una ribozima cabeza de martillo se insertó entre el motivo GGG y el primer nucleótido viral y la  
 ribozima de virus de *hepatitis delta* se colocó cadena abajo del último nucleótido viral. El plásmido pTM-MVSchw  
 resultante habilitó la producción del virus correspondiente utilizando un sistema de genética inversa anteriormente  
 descrita en base a la transfección de células auxiliares humanas (Radecke y col., 1995). Para prevenir la adaptación  
 15 de la vacuna recombinante a células no certificadas, las células auxiliares transfectadas con ADNc se co-cultivaron  
 con fibroblastos embrionarios de pollo, las células en las cuales los virus se seleccionaron originalmente y en las  
 cuales se producen actualmente. Después de varios pasajes del virus recombinante, se observó que la secuencia de  
 su genoma entero era idéntica a la secuencia original (Combredet y col., 2003). La inmunogenicidad del virus  
 rescatado del plásmido pTM-MVSchw se evaluó en ratones y macacos transgénicos y se comparó con la vacuna  
 20 Schwarz fabricada a nivel industrial. Todos los macacos vacunados desarrollaron anticuerpos anti-MV y respuestas  
 celulares específicas. No se observaron diferencias entre el virus Schwarz producido a partir de ADNc y la vacuna  
 original, indicando que el virus clonado tuvo la misma inmunogenicidad que la vacuna parental (Combredet y col.,  
 2003). Este clon molecular permite la producción de vacuna de sarampión Schwarz sin depender de las reservas de  
 semillas.

25 El plásmido pTM-MVSchw se modificó para la expresión en genes extraños mediante la introducción de unidades  
 transcripcionales (ATU) en diferentes posiciones del genoma. Estas ATU son casetes de sitio de multiclonación  
 insertados por ejemplo en una copia de la región N-P intergénica del genoma viral (que contiene las secuencias de  
 actuación *cis* necesarias para la transcripción). El gen de la proteína verde fluorescente potenciada (GFPe) se  
 insertó en este casete. La ATU se introdujo en el plásmido pTM-MVSchw en dos posiciones (entre los genes P y M y  
 30 entre los genes H y L). Independientemente de la secuencia adicional, el número total de nucleótidos antigenómicos  
 se tiene que mantener como un múltiplo de seis para cumplir con la "regla de 6 nucleótidos" que optimiza la  
 replicación viral (Calain y col., 1993). El transgén GFP se expresó en todos los tipos de células infectadas,  
 confirmando que el virus de sarampión Schwarz recombinante funciona como vector. Este vector permite el diseño  
 de vacunas combinadas en base a una cepa de vacuna aprobada atenuada viva que es actualmente de uso global.  
 35 Este trabajo es el objetivo de la solicitud internacional WO 2004/000876 la cual se incorpora como referencia en el  
 presente documento.

El uso de tales vacunas recombinantes vivas basadas en MV a gran escala depende de la posibilidad de cultivarlas  
 de forma estable y en buenos títulos en células certificadas (tales como fibroblastos embrionarios de pollo primarios  
 40 (CEF) o diploide humano MRC5). Estas células habitualmente producen MV en títulos moderados en comparación  
 con las líneas de células de laboratorio, tales como células Vero del mono verde africano, que producen altos títulos.  
 De esta manera la semilla inicial se tiene que obtener en un título relativamente alto. Esta semilla inicial se produce a  
 partir de ADNc por genética inversa.

45 Mientras los virus de ARN o ADN de cadena de sentido positivo pueden fácilmente obtenerse *in vitro* después de la  
 transfección de su ADNc o ADN infeccioso modificado por ingeniería genética en células apropiadas, los virus de  
 ARN de cadena de sentido negativo no pueden rescatarse directamente por genética inversa a partir de su ADNc. El  
 genoma de virus de ARN de cadena de sentido negativo no es capaz de iniciar un ciclo infeccioso *in vitro* a causa de  
 que no codifica directamente proteínas. Tanto la transcripción como la replicación requieren un complejo enzimático  
 50 de transcriptasa-polimerasa contenido en las nucleoproteínas que encapsulan el genoma viral (complejo RNP). De  
 esta manera la generación de virus de ARN de cadena de sentido negativo recombinante a partir de ADNc implica la  
 reconstitución de RNP activos a partir de componentes individuales: ARN y proteínas (Field B.N y col. - Lippincott  
 Raven publishers 1996, págs. 1953-1977).

55 Durante los últimos 15 años, un extraordinario conjunto de trabajos de varios laboratorios ha permitido el  
 establecimiento de diferentes sistemas para rescatar casi todos los virus de ARN de cadena de sentido negativo a  
 partir de su ADNc (para revisión ver Conzelmann). A diferencia de los virus con genomas segmentados, los RNP de  
 virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada (*Mononegavirales*) están estructurados de manera  
 rigurosa y contienen, además de la nucleoproteína (N), el conjunto y la fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P)  
 60 y la proteína grande de ARN polimerasa viral (L). El primer *Mononegavirales* infeccioso, el rhabdovirus de la rabia,  
 se recuperó a partir de ADNc en 1994 (Schnell y col. 1994). El enfoque implicaba expresión intracelular de proteína  
 de virus de rabia N, P y L junto con un ARN de longitud completa cuyo extremo 3' correcto se generó por la ribozima  
 del virus delta de hepatitis (HDV). Un transcrito que corresponde al antigenoma viral (cadena de sentido positivo) en  
 lugar del genoma (cadena de sentido negativo) se utilizó para evitar un problema de antisentido generado por la  
 65 presencia de las secuencias N, P y L en ARN de longitud completa. En este sistema, las proteínas auxiliares  
 esenciales se proporcionaron por un vector de vaccinia con capacidad de replicación que codifica la ARN polimerasa

de fago T7 para dirigir transcripción específica de T7 de plásmidos que codifican las proteínas N, P y L requeridas. Sistemas similares permitieron la recuperación de virus de rabia infecciosos (Schnell y col., 1994; Ito y col. 001), VSV (Lawson y col.; Whelan y col. 1995) así como el virus *Paramyxoviridae Sendai* (Garcin y col. 1995; Kato y col. 1996; Leyrer y col. 1998; Gujii y col. 2002), HP1V-3 (Hoffman y Banerjee 199) y el virus de sarampión (Takeda y col. 2000; Fujii y col. 2002).

Para evitar el uso de vaccinia con capacidad de replicación, la cual requiere que el virus rescatado se separe del virus auxiliar, varios virus auxiliares sin capacidad de replicación se han adaptado para proporcionar proteínas auxiliares para rescatar virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. El virus vaccinia modificado altamente atenuado Ankara (MVA) que expresa la ARN polimerasa de T7 se ha utilizado para la recuperación del Pneumovirus RSV (Collins y col. 1995), el Rubulavirus, SV5 (He y col. 1997), HPIV-3 (Durbin y col. 1997), el virus de la peste bovina (Baron y Barrett 1997) y virus de sarampión (Schneider y col. 1997), virus de parotiditis (Clarke y col. 2000), CDV (Gassen y col. 2000), HPIV-2 (Kawano y col. 2001) y BPIV-3 (Schmidt y col. 2000). Se ha utilizado un virus de viruela aviar recombinante que expresa la ARN polimerasa de T7 para la recuperación del *Paramyxoviridae* aviar NDV (Peeters y col. 1999) y de un virus de peste bovina quimérico (Das y col. 2000).

Para rescatar los *Mononegavirales* sin contaminación por cualquier vector viral infeccioso o sin capacidad de infección, se han generado líneas de células que expresan ARN polimerasa de T3 o T7. En este caso, en ausencia de actividad de protección de ARN en el citoplasma, se consiguió expresión de proteína utilizando IRES de virus de la encefalomiocarditis (EMCV) localizado cadena arriba de las regiones codificantes. Una línea de células de riñón embrionario humano (293-3-46) que expresa ARN polimerasa de T7 y proteínas N y P del virus de sarampión se estableció para recuperar la cepa de vacuna Edmonston de virus de sarampión (Radecke y col. 1995). El virus se rescató después de la transfección de plásmidos especificando ARN antígenómico de MV y ARN L. Se demostró que la eficacia de rescate en estas células, la cual fue muy baja inicialmente, se aumentó por tratamiento de choque de calor de cultivos transfectados y co-cultivo adicional de células transfectadas en células Vero (Parks y col., 1999). Otra línea de células que expresa ARN polimerasa de T7 (BSR T7/5) y basada en células de riñón de hámster bebé (BHK) se utilizó para la recuperación de BRSV (Buchholz y col. 2000), virus de rabia (Finke y Conzelmann 1999), VSV (Harty y col., 2001), NDV (Romer-Oberdorfer y col. 1999) y virus de Ébola (Volchkov y col., 2001).

Los inventores han utilizado la línea de células 293-3-46 para rescatar el vector MV de vacuna Schwarz (Combredet y col., 2003). Sin embargo, ellos han descubierto que, aún utilizando el método de choque de calor en células transfectadas (Parks y col., 1999) y su co-cultivo en células Vero o CEF, el rescate no se pudo reproducir y tuvo muy bajo rendimiento o fue incluso imposible para algunos recombinantes que tienen secuencias adicionales grandes. Esto se debió a la inestabilidad de células auxiliares puesto que se observó que la eficacia depende del número de sus pasajes. Estas células se han generado seleccionando clones resistentes a genética de células 293 transfectadas con pSC6-N, PSC6-P y pSC6-T7-NEO que codifican respectivamente los genes MV N y P y el gen de ARN polimerasa de T7 bajo control del promotor CMV y un gen de resistencia de neomicina (Radecke y col., 1995). La estabilidad de su actividad depende de su selección continua bajo genética (G-418) y la eliminación de antibiótico durante los experimentos de transfección y de rescate. Durante la recombinación ilícita basada en plásmido de ADN extraño en ADN cromosómico, los concatémeros formados por plásmidos se recombinan y la selección de genética mantiene solamente las copias individuales, que son muy pocas. Esto puede explicar la reducción de eficacia observada con las células 293-3-46 después de algunos pasajes. El documento WO97/06270 se refiere también a la línea de células 293-3-46 para la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo, la cual se transfecta de forma estable con plásmidos que codifican la proteína P, la proteína N y la polimerasa de T7, en la cual se asegura la transfección de forma estable mediante la aplicación de una presión de selección con el antibiótico G418.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un método nuevo para generar líneas de células auxiliares capaces de rescatar, de manera reproducible y con gran eficacia, virus de ARN recombinantes de cadena de sentido negativo no segmentada, a partir de ADNc, opcionalmente modificados y sin contaminación de ningún otro virus auxiliar tal como virus vaccinia.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: representación esquemática de los plásmidos HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-T7 (A), HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-nlsT7 (B), HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-N (C) y HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-P (D).  $\Psi$ : motivo psi de envuelta; RRE; elemento sensible a Rev; cPPT: tracto de polipurina central, CTS: secuencia de terminación central, CMVie promotor inmediato temprano de citomegalovirus;  $\Delta$ U3: eliminación de partes de U3.

Figura 2: transferencia de Western que muestra la expresión de proteínas N y P de MV en diferentes lisados celulares; (A) 293T no transducida, línea de células 293-3-46 descrita anteriormente en dos diferentes pasajes (17 y 19), poblaciones celulares 293nlsT-NP y 293T7-NP generadas después de transducción con vectores lentivirales; (B) células Vero infectadas con MV, línea de células 293-3-46 en dos diferentes pasajes (17 y 27), ocho clones de células 293T7-NP; (C) células Vero infectadas con MV, línea de células 293-3-46 (pasaje 17), ocho clones de células 283nlsT7-NP, células Vero no infectadas. Las transferencias se sondearon con anticuerpo NP anti-MV (1/500) y anticuerpo secundario anti-Ig de ratón HRP (1/1000).

### Breve descripción de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos de diversos retrovirus ADN SOLAPADO se definen en diferentes virus: CAEV (SEC ID N° 1), EIAV (SEC ID N° 2), VISNA (SEC ID N° 3), SIV AGN (SEC ID N° 4), VIH-2 RID (SEC ID N° 5), VIH-1 LAI (SEC ID N° 6) y VIH-1 (SEC ID N° 7). Las secuencias de nucleótidos de la ARN polimerasa de T7, la ARN polimerasa de nls T7 y las proteínas N, P y L del virus MV se definen respectivamente en SEC ID N°: 8, 10, 12, 14 y 16 así como sus respectivas secuencias de proteína correspondientes en SEC ID N° 9, 11, 13, 15 y 17. La secuencia de nucleótidos completa del plásmido pTM-MVSchw (CNCM I-2889) se define en la SEC ID N° 18.

### 10 Descripción detallada

La presente invención se refiere a una célula que produce de forma estable a partir de ácido o ácidos nucleicos integrados en su genoma al menos una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos, en el que dicho ácido o ácidos nucleicos es al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con el ácido o ácidos nucleicos que codifican estas al menos ARN polimerasa, nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) o derivados funcionales de los mismos,

20 y en el que dichos derivados funcionales de la ARN polimerasa y/o nucleoproteína (N) y/o fosfoproteína (P) se definen como variantes de la ARN polimerasa y/o de la proteína N y/o de la proteína P que mantienen actividad de la proteína a partir de la cual se obtienen, como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP), funcional en transcripción y replicación en un genoma de virus, en un sistema de rescate que posibilita la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada a partir de ADNc clonado, estando dichas variantes codificadas por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

30 a) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad (solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación del 50% de formamida, 6X SSC a 42° C y condiciones de lavado a 68° C, 0,2X SSC y el 0,1% de SDS) con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo silvestre, la proteína N y la proteína P de una cepa o virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada;

35 b) un ácido nucleico que presenta al menos el 80%, preferentemente el 90%, más preferentemente el 95% o incluso el 99% de similitud con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo silvestre, la proteína N o la proteína P, calculándose dicha similitud a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias; y

40 c) un ácido nucleico que difiere del ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo silvestre, la proteína N o la proteína P en al menos un nucleótido, opcionalmente sustitución conservativa, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, en al menos una supresión o adición de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 supresiones o adiciones de nucleótido;

o siendo un fragmento que representa al menos el 70%, particularmente el 80% y más particularmente el 90% o incluso el 95% de la ARN polimerasa de longitud completa, proteína N o proteína P.

45 Las células de la presente invención son células recombinantes, lo que significa que estas células son el resultado de manipulación genética *in vitro* intencional que da como resultado recombinación de secuencias genómicas de las células con secuencias heterólogas, es decir, secuencias que se originan de una célula o un organismo diferente. Partiendo de células aisladas, se preparan células recombinantes que tienen características genéticas y/o fenotípicas diferentes de las células de partida y también proporcionan la expresión o producción estable de al menos una ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P de uno o varios virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Las células de la invención se reivindican como producto, externo al cuerpo de un ser humano.

55 La expresión "producir de forma estable" significa que las células expresan o producen al menos la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P en un número de divisiones de célula iguales a o superiores a aproximadamente 65, provechosamente durante el tiempo que las células sobreviven. De acuerdo con una realización particular de la invención, las células recombinantes expresan o producen las al menos tres proteínas, es decir al menos la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P, continuamente en el tiempo. De acuerdo con una realización particular de la invención, la integridad, es decir, la secuencia de aminoácidos primaria, de estas tres proteínas se mantiene, asegurando que las proteínas expresadas o producidas sean siempre las mismas.

65 La producción estable de la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P es independiente de la presencia en la célula, de plásmido o plásmidos que portan la secuencia codificante de estas proteínas. Por lo tanto, aunque los plásmidos pueden utilizarse en un paso particular de manipulación de células *in vitro* o *ex vivo*, las células recombinantes resultantes, que producen de forma estable las tres o las al menos tres proteínas, no contienen más plásmidos. De esta manera, la expresión se dice que es independiente de plásmido, al contrario de las células

recombinantes en las cuales la expresión de proteína se dirige por plásmido o plásmidos.

En una realización particular de la invención, la expresión estable de la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P, no requieren la presencia de un fármaco, tal como un antibiótico, es decir, la expresión estable no requiere una presión de selección. Por lo tanto, la producción estable no requiere la presencia obligatoria de plásmido o plásmidos para supervivencia, dicho plásmido tiene la secuencia codificante de la proteína o proteínas que se tienen que expresar.

Otra característica de la invención es que cada una de las tres proteínas, es decir, al menos la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P se producen o expresan a nivel similar a lo largo del tiempo. “*Nivel similar*” como se usa en el presente documento significa que la expresión de cada una de las tres proteínas es constante durante la vida de la célula, incluso después de la división de la célula, con una variación en el nivel de expresión que no es más de aproximadamente el 30%, particularmente no mayor de aproximadamente el 20% y preferentemente no mayor de aproximadamente el 10%, en comparación con la expresión media calculada en diferentes momentos de la vida de la célula.

La ARN polimerasa expresada o producida por las células de la invención es cualquier polimerasa adecuada para sintetizar ARN viral monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada (ARNv) obtenida a partir de un clon de ADNc en un sistema de rescate. La naturaleza de la polimerasa depende esencialmente de la naturaleza de la secuencia de polimerasa de promotor de ARN ubicada en el clon de ADNc del virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada, utilizado para el sistema de rescate (también denominado genética inversa o síntesis *de novo* de virus de ARN de cadena de sentido negativo a partir de ADNc clonado). Como un ejemplo, la ARN polimerasa es la ARN polimerasa de fago T7 o su forma nuclear (nlst7).

Las expresiones “proteína N” y “proteína P” se refieren respectivamente a la nucleoproteína (N) de virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada y la fosfoproteína (P) de virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada. Ejemplos de familias, subfamilias, géneros o especies de virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativa no segmentada a partir de los cuales se puede obtener la proteína N y/o P se enumeran en la Tabla 1.

En una realización particular, las proteínas N y P de un virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada son del mismo virus, bien de la misma cepa de virus o de cepas de virus diferentes. En otra realización, las proteínas N y P de un virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada son de diferentes virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

**Tabla 1:** Familia, subfamilia, género y especie de varios virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada (NNV) del orden *Mononegavirale*.

| Familia                | Subfamilia             | Género               | Especies                                    | Abreviatura |
|------------------------|------------------------|----------------------|---|-------------|
| <i>Rhabdoviridae</i>   | /                      | <i>Vesiculovirus</i> | <i>Virus de estomatitis vesicular</i>       | VSV         |
|                        |                        | <i>Lyssavirus</i>    | <i>Virus de rabia</i>                       | RV          |
| <i>Paramyxoviridae</i> | <i>Paramyxovirinae</i> | <i>Morbillivirus</i> | <i>Virus de sarampión</i>                   | MV          |
|                        |                        |                      | <i>Virus de la peste bovina</i>             | RPV         |
|                        |                        |                      | <i>Virus de moquillo canino</i>             | CDV         |
|                        |                        | <i>Respirovirus</i>  | <i>Virus Sendai</i>                         | SeV         |
|                        |                        |                      | <i>Virus de parainfluenza humana tipo 3</i> | hPIV3       |
|                        |                        |                      | <i>Virus de parainfluenza bovina tipo 3</i> | bPIV3       |
|                        |                        | <i>Rubulavirus</i>   | <i>Virus de simio de tipo 5</i>             | SV5         |
|                        |                        |                      | <i>Virus de parotiditis</i>                 |             |
|                        |                        |                      | <i>Virus de parainfluenza humana tipo 2</i> | hPIV2       |
|                        |                        |                      | <i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i>  | NDV         |

| Familia            | Subfamilia           | Género                  | Especies                                   | Abreviatura |
|--------------------|----------------------|-------------------------|--|-------------|
|                    | <i>Pneumovirinae</i> | <i>Pneumovirus</i>      | <i>Virus sincitial respiratorio humano</i> | hRSV        |
|                    |                      |                         | <i>Virus sincitial respiratorio bovino</i> | bRSV        |
| <i>Filoviridae</i> | /                    | Virus parecidos a Ébola | <i>Virus Ébola</i>                         | /           |

En una realización particular, las proteínas N y P se obtienen a partir de un *Mononegavirus*, preferentemente un virus *Paramyxoviridae*, preferentemente un virus *Paramyxovirinae* y más preferentemente un virus *Morbillivirus*. Un ejemplo de *Morbillivirus* es el virus de sarampión (MV), en particular una cepa no inmunosupresora atenuada, por ejemplo, una cepa aprobada para una vacuna y especialmente la cepa MV Schwarz o la cepa Edmonston (Ed) o un derivado de estas cepas. Una cepa aprobada para una vacuna se define por la FDA (US Food and drug administration) como que tiene las siguientes provisiones: seguridad, eficacia, calidad y reproducibilidad, después de revisiones rigurosas de laboratorio y datos clínicos ([www.fda.gov/cber/vaccine/vacapor.htm](http://www.fda.gov/cber/vaccine/vacapor.htm)).

5 La expresión “derivados funcionales de los mismos” se refiere a cualquier variante funcional incluyendo fragmentos de la ARN polimerasa y/o la proteína N y/o la proteína P, siempre que los derivados funcionales mantengan la actividad de la proteína a partir de la cual se obtienen, al menos como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP), funcional en transcripción y replicación en un genoma de virus, en un sistema de rescate que posibilita la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada a partir de ADNc clonado.

15 Una variante funcional se define mediante un ácido nucleico que codifica dichas proteínas de variante funcionales, teniendo al menos una de las siguientes características:

- 20 - el ácido nucleico que codifica la variante funcional se hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo *nirovestre* (referencia) o con la proteína N y la proteína P de una cepa o virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada identificado. Las condiciones de rigurosidad elevada se definen por Sambrook y col. en *Molecular Cloning: un manual de laboratorio* (1989). Estas condiciones de rigurosidad elevada abarcan: uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8.0), condiciones de hibridación de formamida al 50%, 6X SSC a 42° C y condiciones de lavado de 68° C, 0,2X SSC y SDS al 0,1%. Los protocolos se conocen por los que tienen conocimientos ordinarios en la técnica. Además, los expertos en la materia reconocerán que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado pueden ajustarse según sea necesario de acuerdo con las limitaciones experimentales;
- 25 - el ácido nucleico que codifica la variante funcional presenta al menos el 80%, preferentemente el 90%, más preferentemente el 95% o incluso el 99% de similitud con un ácido nucleico nativo que codifica la ARN polimerasa, la proteína N o la proteína P, calculándose la similitud a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias;
- 30 - el ácido nucleico que codifica la variante funcional difiere del ácido nucleico nativo que codifica la ARN polimerasa, la proteína N o la proteína P en al menos una sustitución de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, opcionalmente sustituciones conservativas (sustituciones de nucleótido que no alteran la secuencia de aminoácidos), en al menos una supresión o adición de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 supresiones o adiciones de nucleótido o nucleótidos.

40 Un fragmento se define en la presente solicitud como una parte de la ARN polimerasa de longitud completa, de la proteína N o de la proteína P, siempre y cuando el fragmento tenga la misma actividad que la proteína completa a partir de la cual se obtiene, al menos como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP) como se describe en el presente documento. En una realización particular, el fragmento representa al menos el 70%, particularmente el 80% y más particularmente el 90 o incluso el 95% de la proteína de longitud completa.

45 Por consiguiente, cuando se hace referencia a la ARN polimerasa, las proteínas N o P o a sus secuencias codificantes, la descripción se aplica de forma similar a sus derivados funcionales como se define en el presente documento.

50 Una célula recombinante de la invención comprende, integrada en su genoma, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Opcionalmente, los ácidos nucleicos que codifican las tres proteínas anteriores están, cada uno o al menos uno de los mismos, bajo el control de elemento o elementos reguladores de la transcripción. La expresión “integrado en el genoma” significa que la al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control de elemento o elementos reguladores de la transcripción está ubicada dentro del genoma de las células recombinantes, en condiciones que permiten que las células expresen de forma estable la proteína codificada por el ácido nucleico. En una realización particular, la célula recombinante de la invención comprende además, integrada en su genoma, al menos una copia de un ácido

nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

“Al menos una copia” significa que el ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa y/o la proteína N y/o la proteína P y/o la proteína L puede estar presente en una o varias copias, preferentemente exactamente o al menos en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 copias o más, dependiendo del nivel de expresión necesario para cada una de estas proteínas.

Las células de la invención también contienen al menos una copia de ADN solapado integrada en el genoma celular. Un ADN solapado es una secuencia de nucleótidos de origen retroviral, especialmente lentiviral o similar a retroviral que comprende dos regiones esenciales, es decir, el TPPc (tracto de polipurina central) y la CTS (región de terminación de acción en cis), en donde las regiones TPPc y CTS inducen una estructura de ADN de tres cadenas durante la replicación del ADN que las contiene (previamente definido en Zennou y col., 2000; y en las solicitudes WO99/55892 y WO02/27300). En una realización particular, el ADN solapado se inserta inmediatamente cadena arriba del promotor interno que posibilita la transcripción de los ácidos nucleicos que codifican la ARN polimerasa, la proteína N, la proteína P y posiblemente la proteína L.

Un ADN solapado adecuado para la invención puede obtenerse a partir de un retrovirus especialmente a partir de un lentivirus u organismo similar a retrovirus tal como retrotransposón, sintéticamente preparado (síntesis química) o por amplificación del ADN solapado de cualquier retrovirus especialmente de un ácido nucleico de lentivirus tal como mediante reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). El ADN solapado puede obtenerse a partir de un retrovirus, especialmente un lentivirus, especialmente un retrovirus o lentivirus humano y en particular a partir de un retrovirus de VIH, el virus CAEV (Virus de Artritis Encefalitis Caprina), el virus EIAV (Virus de Anemia Infecciosa Equina), el virus VISNA, el virus SIV (Virus de Inmunodeficiencia de Simio) o el FIV virus (Virus de Inmunodeficiencia Felina). En una realización más preferida, el ADN solapado se obtiene a partir de un retrovirus de VIH, por ejemplo VIH-1 o VIH-2 o cualquier aislado diferente de estos dos tipos.

El ADN solapado preferido comprende o consiste en las secuencias como se define en SEC ID N°: 1 a 7. Se debe de mencionar que el ADN solapado se utiliza aislado de su contexto de nucleótido natural (genoma viral), es decir aislado del gen *pol* en el cual está contenido naturalmente en un lentivirus. Por lo tanto, el ADN solapado se utiliza, en la presente invención, con las partes 5' y 3' que no son necesarias del gen *pol* suprimidas y se recombina con secuencias de diferentes orígenes. De acuerdo con una realización particular, un ADN solapado tiene una secuencia de nucleótidos de aproximadamente 100 a aproximadamente 140 nucleótidos.

La invención también se refiere a una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con (1) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, (2) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y (3) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican a estas células.

La invención también se refiere a una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con (1) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, (2) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, (3) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y (4) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican a estas células.

La invención abarca una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con un vector de expresión que comprende al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y un ADN solapado. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican a estas células. En una realización particular, el vector de expresión comprende además al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

La solicitud también describe un vector de expresión derivado de retroviral que comprende un ADN solapado como se ha descrito anteriormente y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína necesaria para el rescate de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. En un vector particular, el ácido nucleico codifica una proteína que se selecciona entre el grupo que consiste en una ARN polimerasa, una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

El término “genoma” se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico cuya presencia en la célula no depende de la



selección de presión, es decir cuya presencia en la célula es permanente y/o no depende de las condiciones ambientales. El término “genoma” no incluye los plásmidos. Principalmente, el término “genoma” se refiere a moléculas de ácido nucleico presentes en el núcleo de la célula (genoma nuclear), al contrario de moléculas de ácido nucleico presentes en el citoplasma, e incluye, por ejemplo, los cromosomas. En una realización particular, el término “genoma” también incluye moléculas de ácido nucleico presentes en compartimentos celulares particulares, tales como organelas, por ejemplo mitocondria (genoma mitocondrial) o cloroplastos (genoma de cloroplasto). En una realización particular, el genoma es de una célula eucariota.

Un vector derivado de retroviral y particularmente un vector lentiviral, es un genoma viral que comprende los elementos necesarios para la retrotranscripción, particularmente las LTR posiblemente mutadas que incluyen supresión en parte especialmente supresión en la región U3, como se ilustra a continuación y provechosamente el ADN solapado. Estas regiones de LTR y ADN solapado pueden ser las únicas secuencias de origen retroviral, especialmente lentiviral en el vector de expresión derivado de retroviral. En ningún caso, el vector derivado de retroviral contiene las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas retrovirales de longitud completa. En una realización particular, el vector derivado de retroviral comprende o consiste en un ADN solapado y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína necesaria para el rescate de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada como se describe en el presente documento, así como las LTR del genoma viral correspondiente.

Un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa o parte funcional de la misma. Un vector de este tipo puede ser el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-T7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3702, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de fago T7 (SEC ID N°: 8) o el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-nlsT7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3703, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la forma nuclear de la ARN polimerasa de fago T7 (SEC ID N°: 10).

Un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Un vector de este tipo puede ser el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-N depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3700, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la proteína N de MV Schwarz (SEC ID N°: 12).

Un vector de expresión descrito en el presente documento comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Un vector de este tipo puede ser el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-P depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3701, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la proteína P de MV Schwarz (SEC ID N°: 14).

Los vectores CNCM I-3700 a 3703 mencionados anteriormente se contienen en la cepa de *E. coli* (JM109), cultivada en medio LB complementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) a 37° C con agitación.

Los cuatro plásmidos anteriores son ejemplos de vectores que pueden utilizarse en la recombinación de células para obtener células recombinantes de la invención. Sin embargo, estos ejemplos no constituyen limitaciones de la invención; por lo tanto y como se ha descrito anteriormente, las proteínas N y P (o sus derivados funcionales) pueden obtenerse a partir de cualquier virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, la polimerasa de T7 puede ser cualquier ARN polimerasa, el promotor CMV puede ser cualquier promotor, el ADN solapado TRIP puede ser cualquier ADN solapado y el vector de expresión de VIH-1 puede ser cualquier vector y particularmente cualquier vector viral.

Otros vectores de expresión comprenden un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN cadena de sentido negativo no segmentada o comprenden un ADN solapado y ácido o ácidos nucleicos que codifican una ARN polimerasa, una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y opcionalmente una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

El término “vector de expresión” indica que, además de los elementos mencionados explícitamente, el vector comprende todos los elementos necesarios para dirigir la expresión del ácido o ácidos nucleicos que codifican las proteínas de interés y particularmente elementos reguladores de transcripción. “Elemento regulador de transcripción” define cualquier región de ADN implicada en la regulación de transcripción del ácido o ácidos nucleicos integrados en el genoma, e incluye un promotor, tal como CMV, EF1 $\alpha$  o mPGK (fosfoglicerato quinasa murina) o más generalmente cualquier promotor adecuado para la inserción en un vector retroviral, especialmente un vector

lentiviral, potenciador o elementos reguladores de acción en cis. Estos elementos y particularmente el promotor se eligen dependiendo de la naturaleza de las células recombinantes. La determinación del promotor adecuado, de acuerdo con el nivel de expresión buscado o con la célula recombinada, es parte del conocimiento del experto en la materia. Se ha de mencionar que, cuando la célula recombinante contiene varios ácidos nucleicos heterólogos (también polinucleótidos designados) que codifican las proteínas de interés, dichos elemento o elementos reguladores de transcripción pueden ser únicos para todos los ácidos nucleicos o compartidos por alguno de ellos o por el contrario cada ácido nucleico puede estar asociado con un elemento regulador de transcripción. En el último caso, los elementos reguladores de transcripción pueden ser similares o diferentes.

La presencia del ADN solapado, en todos los vectores utilizados en la etapa de recombinación, lleva a la formación de una estructura triple de ADN (de tres cadenas) en la posición del ADN solapado (entre los dominios cPPT y CTS), posibilitando la importación del ácido nucleico que porta el ADN solapado en los núcleos de la células (a través del poro de la membrana del núcleo) y además la integración en el genoma de esta célula. El ADN solapado actúa como un determinante de cis de la importación nuclear del vector. En un primer aspecto, la presencia del ADN solapado es de gran interés para la recombinación y la integración del ácido o ácidos nucleicos en células que no se dividen, puesto que en ausencia de división celular (y desintegración de membrana), la importación (y por tanto la integración de ácido(s) nucleicos en el genoma de la célula) es identificada únicamente como actividad residual; por lo tanto, los vectores que contienen el ADN solapado son vectores retrovirales no replicativos capaces de transducir células que no se dividen. En un segundo aspecto, la presencia del ADN solapado es también de gran interés para la recombinación y la integración de ácido nucleico en las células que se dividen, mejorando considerablemente el porcentaje de células en las cuales se integra el ácido nucleico que contiene el ADN solapado. La inserción de la secuencia de ADN solapado en un vector de expresión, como se describe en la presente memoria descriptiva, aumenta de forma marcada la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* mediante la estimulación de la importación nuclear del vector de ADN (Sirven y col., 2001, Zennou y col., 2001). Los vectores de VIH que incluyen la secuencia de ADN solapado (vectores TRIP) son capaces de transducir las células B y T primarias, macrófagos, células dendríticas, etc. con una eficacia diez veces más elevada que otros vectores de VIH que carecen del ADN solapado. Puede obtenerse una transducción del 80-90% de células de forma rutinaria.

A continuación de la recombinación por el vector o vectores que contienen un ADN solapado y ácido o ácidos nucleicos que codifican las al menos tres proteínas de interés y la integración de estos ácidos nucleicos en el genoma, las células recombinantes producen de manera estable la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P.

Los vectores de expresión descritos en el presente documento, utilizados para obtener las células recombinantes de la presente invención, son vectores virales y particularmente vectores de expresión viral, tales como derivados retrovirales, especialmente vectores derivados de lentivirales, tales como vectores derivados de VIH-, FIV- o SIV-. Más particularmente, el vector derivado de lentiviral es un vector derivado de lentiviral humano tal como un vector de expresión de VIH, particularmente vector derivado de VIH-1 o VIH-2. En una realización preferida, el vector viral es un vector de expresión de VIH que comprende un ADN solapado como se ha descrito anteriormente y al menos un ácido nucleico que codifica las al menos tres proteínas de interés. Los vectores de VIH son vectores retrovirales de reemplazo clásicos en los cuales sustancialmente las secuencias virales codificantes completas se reemplazan por la secuencia que se tiene que transferir. Por lo tanto, los vectores de VIH expresan solamente los ácidos nucleicos heterólogos contenidos entre las dos LTR de VIH o LTR mutadas y bajo el control del ADN solapado. Por tanto, estos vectores pueden alojar polinucleótidos grandes que tienen hasta 5-6 kb. Una realización particular es un virus de expresión de VIH como se ha descrito anteriormente y más particularmente un vector de expresión de VIH-1, en el que una LTR de VIH-1 se elimina para el promotor y el potenciador del dominio U3 ( $\Delta$ U3). Se ha demostrado previamente que esta supresión particular aumenta la expresión de los ácidos nucleicos contenidos en el vector y particularmente cuando se asocian con un promotor.

En una realización particular, la célula recombinante de la invención se puede obtener por recombinación de su genoma con los plásmidos HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-T7, HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-N y HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV.P o con los plásmidos HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-nlsT7, HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-N y HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-P.

Las células de la invención pueden ser células procariotas o eucariotas, particularmente células de animales o plantas y más particularmente células de mamífero tales como células humanas o células de mamífero no humanas. En una realización particular, las células, antes de la recombinación de su genoma, se aíslan bien sea a partir de un cultivo primario o de una línea de células. Las células de la invención pueden ser células que se dividen o células que no se dividen. Un ejemplo de células que pueden recombinarse para proporcionar las células recombinantes de la invención son las células HEK 293 (riñón embrionario humano), línea de células 293 que está depositada en la ATCC con el número CRL-1573.

Las células recombinantes de la invención pueden ser la línea de células 293-T7-NP depositada en el CNCM (París, Francia) el 14 de junio de 2006 con el número I-3618, es decir, células HEK-293 recombinadas con los plásmidos HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-T7, HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-N y HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-P. Otro ejemplo de células recombinantes de la invención es la línea de células 293-nlsT7-NP MV depositada en el CNCM el 4 de agosto de 2006, con el número I-3662, es decir las células HEK-293 recombinadas con plásmidos HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-nlsT7, HIV-1-

TRIP $\Delta$ U3.CMV-N y HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-P.

5 En una realización adicional de la invención, las células recombinantes de la invención se recombinan adicionalmente por un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. La expresión de la proteína L puede ser temporal y dirigida por un plásmido que no contiene un ADN solapado o al contrario puede ser estable y dirigida por un vector que contiene un ADN solapado como se ha definido anteriormente. La recombinación por un plásmido o vector que porta la al menos una copia del ácido nucleico que codifica la proteína L puede ser simultánea o posterior a la recombinación por el vector o vectores que contienen la secuencia o secuencias codificantes de la ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una célula de la invención que produce también de manera estable o no una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

15 La proteína L se obtiene a partir de cualquier virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada mencionado en la Tabla 1. En una realización particular, la proteína L es del mismo virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada que la proteína N y/o la proteína P y particularmente de la misma cepa de virus. En otra realización, la proteína L es de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada diferente a la proteína N y/o proteína P.

20 En una realización particular, la proteína L es de un virus *Paramyxoviridae*, preferentemente un virus *Paramyxovirinae* y más preferentemente un virus *Morbillivirus*. Un ejemplo de *Morbillivirus* es el virus de Sarampión (MV), en particular una cepa no inmunosupresora atenuada, por ejemplo una cepa aprobada para una vacuna y especialmente la cepa Schwarz MV o la cepa Edmonston (Ed). Una proteína L particular es la del virus MV (SEC ID N°: 16).

30 La secuencia de la proteína L no debe estar modificada con relación a la proteína L de tipo silvestre y debe ser funcional, es decir permitir la producción de partículas o virus cuando se transcomplementa con las proteínas N y P y una polimerasa de T7 en una célula hospedadora. Una prueba para determinar la funcionalidad eficaz de un clon que porta la proteína L se lleva a cabo por transfección de una célula competente con vector o vectores que codifican la proteína N, la proteína P y polimerasa de T7 (o nlsT/), un vector que codifica la proteína L que se tiene que ensayar y un minigenoma que comprende un líder, un promotor, un gen informador (tal como GFP) y un remolque. La funcionalidad del clon L se revela por la producción de partículas que expresan el gen informador.

35 La presente invención también describe una célula de acuerdo con la presente memoria descriptiva recombinada adicionalmente con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, es decir la cadena (+) de ARN antígenómica del genoma de virus. "ADNc" utilizado para la descripción de la secuencia de nucleótidos de la molécula de la invención se refiere simplemente al hecho de que originalmente dicha molécula se obtiene por transcripción inversa del genoma de ARN genómico (-) de partículas virales de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, particularmente del virus de sarampión y más preferentemente el genoma de ARN genómico (-) de longitud completa de partículas virales de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Esto no debe considerarse una limitación de los métodos utilizados para la preparación de este clon de ADNc. Por tanto, la invención abarca, dentro del término "ADNc", cualquier ADN siempre que tenga la secuencia de nucleótidos definida anteriormente. Los ácidos nucleicos purificados, incluyendo el ADN o plásmidos están dentro del significado de ADNc de acuerdo con la invención, siempre que el ácido nucleico especialmente ADN cumpla con las definiciones definidas anteriormente.

50 En una realización particular, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada contiene, cadena arriba de las secuencias virales, elementos reguladores de transcripción. En una realización preferida, estos elementos son los mismos que los ubicados en el vector o vectores de expresión que comprenden las proteínas N, P y/o L descritas anteriormente. En una realización más preferida, el elemento es un promotor de ARN polimerasa de T7.

55 En una realización, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es del mismo virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada que la proteína N y/o la proteína P y/o la proteína L y particularmente de la misma cepa de virus. En otra realización, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada diferente que la proteína N y/o la proteína P y/o la proteína L.

60 En una realización particular, el clon de ADNc es de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tal como un virus *Paramyxoviridae*, preferentemente un virus *Paramyxovirinae* y más preferentemente un virus *Morbillivirus*. Un ejemplo de *Morbillivirus* es el virus de Sarampión (MV), en particular una cepa no inmunosupresora atenuada, por ejemplo una cepa aprobada para una vacuna y especialmente la cepa Schwarz MV o la cepa Edmonston (Ed). Además, la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada puede modificarse en comparación con la cepa o virus de tipo silvestre, tal como se define más adelante.

La invención también se refiere a cultivos de células en donde dichas células son las que se definen en las reivindicaciones y particularmente cultivos de células que producen de manera estable una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de las mismas. En otra realización, la invención también se refiere a cultivos de células que producen de manera estable una ARN polimerasa, una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de las mismas y que producen, de manera estable o transitoria una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de la misma.

En una realización, el cultivo de células que se tienen que recombinar es un cultivo primario, es decir un cultivo preparado a partir de células o tejidos obtenidos directamente de un animal (opcionalmente no humano) o una planta. En otra realización, el cultivo de células que se tienen que recombinar es una línea celular, es decir una población de células que se producen como resultado del primer sub-cultivo de un cultivo primario o de un pasaje en serie posterior de las células.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a diversos métodos para producir virus infeccioso, recombinante, de cadena de sentido negativo no segmentada, utilizando las células de la invención.

Un primer método para producir virus de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante comprende o consiste en:

- a. recombinación de una célula o cultivo de células que produce de manera estable una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y la fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada como se define en las reivindicaciones, con un clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada,
- b. transferencia de una célula recombinante o cultivo de células recombinantes en células con capacidad para mantener la replicación y producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
- c. recuperación del virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir del co-cultivo de la etapa b.

Un segundo método de acuerdo con la invención es un método para producir un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante, que comprende o consiste en:

- a. recombinación de una célula o cultivo de células que produce de manera estable una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y la fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada como se define en las reivindicaciones y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
- b. recuperación del virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de la célula recombinante o cultivo de células recombinantes.

Como se usa en el presente documento, "recombinar" significa introducir al menos un polinucleótido en una célula, por ejemplo en forma de vector, integrándose dicho polinucleótido (completamente o parcialmente) o sin integrarse en el genoma de la célula (como se ha definido anteriormente). De acuerdo con una realización particular la recombinación puede obtenerse con un primer polinucleótido el cual es un clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, cuya definición, naturaleza y modificaciones opcionales se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva. La recombinación puede, también o como alternativa, incluir introducir un polinucleótido el cual es un vector que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, cuya definición, naturaleza y estabilidad de expresión se han descrito en el presente documento.

En estos métodos, la célula o un cultivo de células que producen de manera estable una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es una célula como se define en las reivindicaciones o un cultivo de células como se define en las reivindicaciones, es decir, también son células recombinantes en la medida en que se han modificado mediante la introducción de uno o más polinucleótidos como se ha definido anteriormente. En una realización particular de la invención, la célula o cultivo de células, que producen de manera estable la ARN polimerasa, las proteínas N y P, no producen la proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o no producen de manera estable la proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, por ejemplo, que posibilita la expresión o

producción transitoria.

“Transferencia” como se usa en el presente documento se refiere a la siembra en placas de las células recombinantes en un tipo de célula diferente y particularmente en monocapas de un tipo de célula diferente. Estas células tienen capacidad para mantener tanto la replicación como la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante, es decir, respectivamente la formación de virus infecciosos dentro de la célula y posiblemente la liberación de estos virus infecciosos fuera de las células. Esta transferencia da como resultado el co-cultivo de las células recombinantes de la invención con células competentes como se define en la frase anterior. La transferencia puede ser un paso adicional, es decir un paso opcional, cuando las células recombinantes no son cultivos eficaces productores de virus, es decir que los virus infecciosos no se pueden recuperar eficazmente de estas células recombinantes. Este paso se introduce después de la recombinación adicional de células recombinantes de la invención con un clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y opcionalmente un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

En una realización particular de la invención, se requiere una etapa de transferencia puesto que las células recombinantes, habitualmente elegidas por su capacidad de recombinarse fácilmente no son lo suficientemente eficaces para el mantenimiento y la producción de virus infecciosos recombinantes. En dicha realización, la célula o cultivo de células de la etapa a. de los métodos definidos anteriormente es una célula recombinante o cultivo de células recombinantes de acuerdo con la invención, particularmente células HEK-293 recombinantes tales como la línea de células 293-T7-NP depositada en el CNCM el 14 de junio de 2006 con el número I-3618 o la línea de células 293-nlsT7-NP MV depositada en el CNCM el 4 de agosto de 2006 con el número I-3662.

Las células competentes para mantener la replicación y producción de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada pueden ser cualquier tipo de células que se pueden co-cultivar con las células recombinantes de la invención pero no necesariamente células del mismo Reino, Phylum, Clase, Orden, Familia, Género o Especie. Los ejemplos de células competentes son las células Vero (riñón de mono verde africano) o células CEF (fibroblastos embrionarios de pollo). Las células CEF pueden prepararse a partir de huevos de pollo fertilizados como se obtienen por EARL Morizeau (8, rue Moulin, 28190 Dangers, Francia) o de cualquier otro productor de huevos de gallina fertilizados o a partir de células MRC5 (ATCC CCL171, fibroblasto de pulmón).

En otra realización de la invención, la etapa de transferencia no es necesaria y por lo tanto no se lleva a cabo. Esta es una de las ventajas de la presente invención para proporcionar un método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infecciosos, recombinantes que es fácil de llevar a cabo, más rápido y más barato que los métodos convencionales que permiten la recuperación de virus infecciosos recombinantes libres de contaminantes. Esto se puede conseguir con las células recombinantes de la invención que tienen las características de:

- producir de manera estable una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
- a partir de los cuales se pueden recuperar de manera eficaz los virus infecciosos recombinantes, sin contaminaciones por virus no deseados y/u otros tipos de células.

La “recuperación de virus recombinantes infecciosos” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier medio, por el cual los virus infecciosos, producidos por las células, se liberan a partir de las células y se aíslan a partir de las células cultivadas. La recuperación se dice que es “directa” cuando los virus recombinantes infecciosos se recuperan a partir de las células recombinantes de la invención, sin involucrar otro tipo de célula o células. Por el contrario, la recuperación se dice que es “indirecta” cuando los virus infecciosos recombinantes se recuperan a través de otros tipos de células diferentes a las células recombinantes de la invención. Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención es la primera en informar la recuperación directa del virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante.

En métodos particulares de la invención, la etapa de recombinación no comprende las etapas de recombinación de una célula o un cultivo de células que producen de manera estable una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. En este caso, las células recombinantes de la invención se han seleccionado por su capacidad de expresar la proteína L y especialmente se han recombinado previamente con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L), integrándose el ácido nucleico que codifica la proteína L en el genoma de célula o no.

Cuando los vectores adecuados que portan proteínas complementarias (no-P, no-L o no-N o no ARN polimerasa) pueden opcionalmente utilizarse en los métodos de la invención, particularmente cuando se utiliza un genoma o un clon de ADNc en el que se han suprimido estas proteínas. Tales proteínas accesorias son la proteína C, la proteína V, la proteína NS1, la proteína NS2, la proteína M, la proteína M2 y/o las proteínas SH. El vector o vectores que contienen las secuencias codificantes de estas proteínas accesorias pueden opcionalmente comprender un ADNc solapado como se ha definido anteriormente.

La estabilidad de la producción de ARN polimerasa, la proteína N y la proteína P en las células recombinantes de la invención tiene algunas ventajas de acuerdo con los métodos anteriormente descritos en la técnica:

- el método de la invención no necesariamente comprende una etapa de transferencia;
- el método no comprende la etapa de choque de calor como se informa en Parks y col. (1999). De hecho, se ha demostrado que esta etapa mejora la eficacia de la síntesis de las proteínas N o P virales, así como ARN polimerasa, proteínas que son sintetizadas a partir de ácidos nucleicos portados por plásmidos. En la presente invención, sin embargo, los ácidos nucleicos se integran en el genoma celular y se ha demostrado que la expresión de estas proteínas es estable, y/o a un nivel adecuado para iniciar la encapsidación *de novo*.
- el método produce grandes cantidades de virus infecciosos, puesto que la producción de la ARN polimerasa, proteína N y proteína P es estable y no depende de su expresión a partir de los plásmidos. Por lo tanto, aproximadamente 100-400 de  $10^6$  células recombinadas transmiten virus infecciosos después de la recombinación (número de acontecimientos de rescate). Esto es mucho mayor a 1-6 de  $10^6$  células transfectadas obtenidas con el método de Radecke y col (1995). En una realización particular del método, el número de acontecimientos de rescate, para  $10^6$  células recombinadas es más de 20, más de 50, más de 100, más de 200, más de 300, más de 400 o más de 500.

Finalmente, otra ventaja de la invención es la gran variedad de células que pueden recombinarse y utilizarse para llevar a cabo la invención. De hecho, las células recombinantes pueden ser cualquier célula eucariota, particularmente cualquier célula de mamífero, bien sea una célula no-humana o una célula humana. En una realización particular, las células recombinantes de la invención son fibroblastos humanos, especialmente la línea de células MRC5 (fibroblastos de pulmón humano). La invención es particularmente útil para células que no se dividen.

De acuerdo con la invención, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus MV, en particular un virus atenuado en particular una cepa no inmunosupresora atenuada, por ejemplo, una cepa aprobada para una vacuna, tal como la cepa Schwarz MV. En una realización particular de la invención, las proteínas N, P y L, así como el clon de ADNc son del mismo virus, que puede ser cualquier virus de la Tabla I, particularmente un virus MV como se ha descrito anteriormente, tal como la cepa Schwarz MV del virus de sarampión. Las secuencias de nucleótidos de la cepa Edmonston B. y la cepa Schwarz se han descrito en el documento WO98/13505. Independientemente de la naturaleza de las proteínas N, P y L y el clon de ADNc del virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, la ARN polimerasa es la ARN polimerasa de T7. Una secuencia de ADNc particular es la secuencia del ADNc de la cepa Schwarz como se define en la SEC ID N°: 18. Un ADNc de este tipo puede obtenerse a partir de pTM-MV Schw, que es un plásmido obtenido a partir de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión, cepa Schwarz de vacuna, bajo el control del promotor de la ARN polimerasa de T7. Su tamaño es de 18967nt.

Como alternativa, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada se obtiene a partir de cualquier virus de la Tabla I. Un virus de sarampión recombinante particular a partir del cual se obtiene un clon de ADNc es la cepa Schwarz y especialmente una cepa Schwarz de vacuna aprobada, tal como la producida bajo la marca Rouvax, disponible de Aventis Pasteur (Francia).

“Obtenido a partir de” como se usa en el presente documento significa cualquier clon de ADNc cuya secuencia de nucleótidos está modificada en comparación con un virus o cepa de tipo silvestre. Esta modificación puede ser al menos una sustitución, supresión o inserción en la secuencia de nucleótidos y particularmente en la secuencia codificante de una proteína del virus o cepa. En otra realización, la secuencia de nucleótidos se modifica mediante la inserción de al menos un ácido o ácidos nucleicos heterólogos, es decir, una secuencia que no está presente naturalmente en el virus o la cepa en la cual se inserta el al menos un ácido o ácidos nucleicos o una secuencia que no se obtiene a partir de los antígenos del virus de sarampión. Además, el clon de ADNc se puede modificar mediante la supresión de parte o partes del genoma viral de tipo silvestre y la inserción de ácidos nucleicos heterólogos.

En una realización preferida, se señala que el clon de ADNc obtenido, que consiste o que comprende uno o varios ácido o ácidos nucleicos heterólogos, cumple con la denominada regla de 6. Por lo tanto, el clon de ADNc obtenido es de longitud polihexamérica, es decir múltiplo de seis.

Cualquier ácido nucleico heterólogo se puede insertar en la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc, siempre y cuando la inserción no evite la producción de virus de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso (sitios permisivos). En una realización particular, la inserción o eliminación del genoma viral nativo proporciona un

polinucleótido el cual es un múltiplo de seis. De esta manera, aún si la longitud del genoma no es un múltiplo de seis, la modificación consiste en seis o un múltiplo de seis supresiones y/o inserciones.

- 5 Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico heterólogo pueden codificar uno o varios péptidos capaces de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular (tal como la respuesta CTL o CD4) en un huésped determinado, frente al organismo u organismos especialmente los organismos patógenos, por ejemplo el virus, especialmente retrovirus, flavivirus o coronavirus, de la bacteria o parásitos a partir de los cuales se originan. Por consiguiente, la
- 10 secuencia de aminoácidos de este péptido es una que comprende al menos un epítipo de un antígeno, especialmente un epítipo conservado, epítipo que está expuesto de forma natural en un antígeno o se obtiene o está expuesto como resultado de una mutación o modificación o combinación de antígenos. Los ácidos nucleicos heterólogos, que pueden insertarse en los clones de ADNc, codifican especialmente antígenos estructurales (incluyendo fragmentos antigénicos de los mismos) de virus que incluyen retrovirus tales como retrovirus humanos especialmente lentivirus, flavivirus o envuelta de coronavirus, tal como un antígeno de envuelta o cápside. Particularmente, tales antígenos son especialmente de envueltas de virus de SIDA que incluyen VIH-1 o VIH-2, de la
- 15 cápside de VIH o de envueltas del Virus de la Fiebre Amarilla o envueltas del Virus del Nilo Occidental o de envueltas del virus de Dengue (DV), envueltas del virus de encefalitis japonesa (JEV) o envuelta del coronavirus asociado con SARS. Sin embargo, otros antígenos retrovirales, flavivirales o de coronavirus se pueden utilizar de forma provechosa, con el fin de obtener virus de sarampión recombinantes capaces de provocar anticuerpos frente a dichos retrovirus o flavivirus, y/o capaces de provocar la producción de anticuerpos neutralizados frente a retrovirus
- 20 o flavivirus. En otra realización, el péptido codificado o incluido por las secuencias de ácido nucleico es antígeno tumoral o un antígeno expresado específicamente en la superficie de célula de las células de cáncer. De acuerdo con otra realización de la invención, las secuencias codifican multiepítopos o antígenos que como alternativa o adicionalmente provocan una respuesta inmune celular frente a retrovirus o flavivirus.
- 25 Provechosamente, los virus de sarampión recombinantes producidos por el método de la invención pueden también provocar una respuesta inmune humoral y/o celular frente a virus de sarampión. Sin embargo esta respuesta es no obligatoria siempre que se obtenga, de hecho, la respuesta inmune frente al epítipo o multiepítopos o antígenos descritos anteriormente.
- 30 En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína a partir de un retrovirus de VIH, particularmente un antígeno de envuelta de VIH y especialmente un péptido derivado de una proteína o glicoproteína de envuelta de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de interés a este respecto son especialmente gp160, gp120 y gp41 de VIH-1 o gp140, GAG o TAT de VIH-1. En una realización particular de la invención, la secuencia de aminoácidos heteróloga se obtiene a partir de un gp160, gp120 de VIH-1 o gp140, GAG o TAT de VIH-
- 35 1 recombinantes.
- En otra realización, los bucles V1, V2 y/o V3 del antígeno gp120 (o gp160) se suprimen o se suprimen parcialmente, individualmente o en combinación de manera que los epítopos conservados se exponen en el antígeno gp120 recombinante obtenido. Los bucles V1, V2 y V3 del antígeno gp120 (o gp160) de VIH-1 se han descrito especialmente en Fields virology (Fields B.N. y col. Lippincott Raven publishers 1996, págs. 1953-1977).
- 40 En otra realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que se obtiene a partir del antígeno gp120 (o gp160) de VIH-1, en donde los bucles V1, V2 y/o V3 del antígeno gp120 (o gp160) se sustituyen o se sustituyen en parte, individualmente o en combinación, de manera que los epítopos conservados se exponen en el antígeno gp120 (o gp160) recombinante obtenido.
- 45 En otra realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que se obtiene a partir de un antígeno de envuelta de VIH-1, especialmente se obtiene a partir del antígeno gp120 de manera que los bucles V1 y V2 se suprimen y el bucle V3 se sustituye por la secuencia AAELDKWASAA.
- 50 En otra realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que es gp160 $\Delta$ V3, gp160 $\Delta$ V1V2, gp160 $\Delta$ V1V2V3, gp140 $\Delta$ V3, gp140 $\Delta$ V1V2, gp140 $\Delta$ V1V2V3.
- 55 Los clones de ADNc preferidos que contienen epítopos de VIH, WNV, YFV, DV o JEV son vectores definidos en la Tabla II depositados en el CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos – Institut Pasteur-París, Francia) y cuyas características se proporcionan a continuación.

| Tabla II: Cepa a partir de la cual se obtiene la secuencia | Nombre del vector  | Número de depósito | Fecha de depósito   |
|--|--|--------------------|---------------------|
| Cepa Edmonston B.  | pMV2(EdB)gp160[delta]V3HIV89.6P                          | CNCM I-2883        | 12 de junio de 2002 |
|  | pMV2(EdB)gp160HIV89.6P                                   | CNCM I-2884        |                     |
|  | pMV2(EdB)gp140HIV89.6P                                   | CNCM I-2885        |                     |
|  | pMV3(EdB)gp140[delta]V3HIV89.6P                          | CNCM I-2886        |                     |
|  | pMV2(EdB)-NS1YFV17D                                      | CNCM I-2887        |                     |
|  | pMV2(EdB)-EnvYFV17D                                      | CNCM I-2888        |                     |
| Cepa Schwarz   | pTM-MV Schw2-Es(WNV)                                     | CNCM I-3033        | 26 de mayo de 2003  |
|  | pTM-MV Schw2-GFPbis                                      | CNCM I-3034        |                     |
|  | pTM-MV Schw2-p17p24[delta]myr(HIVB)                      | CNCM I-3035        |                     |
|  | pTM-MV Schw3-Tat(HIV89-6p)                               | CNCM I-3036        |                     |
|  | pTM-MV Schw3-GFP   | CNCM I-3037        |                     |
|  | pTM-MV Schw2-Es(YFV)                                     | CNCM I-3038        |                     |
|  | pTM-MV Schw2-gp140[delta]V1V2V3(HIV89-6)                 | CNCM I-3054        | 19 de junio de 2003 |
|  | pTM-MV Schw2-gp140[delta]V3(HIV89-6)                     | CNCM I-3055        |                     |
|  | pTM-MV Schw2-gp160[delta]V1V2V3(HIV89-6)                 | CNCM I-3056        |                     |
|  | pTM-MV Schw2-gp160[delta]V1V2(HIV89-6)                   | CNCM I-3057        |                     |
|  | pTM-MV Schw2-GagSIV239p17-p24[delta]myr-3-gp140(HIV89-6) | CNCM I-3058        |                     |
|  | pTM-MV Schw2[EDIII+M <sup>1-40</sup> ]WNV(IS-98-ST1)     | CNCM I-3440        | 26 de mayo de 2005  |
|  | pTM-MV Schw2[EDIII+apoptoM]DV1(FGA89)                    | CNCM I-3442        |                     |
|  | pTM-MV Schw2[EDIII]JEV(Nakayama)                         | CNCM I-3441        |                     |



- 5 I-2883 (pMV2(EdB)gp160[delta]V3HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen del gp160ΔV3+ELDKWAS de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21264 nt.
- 10 I-2884 (pMV2(EdB)gp160HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen de gp160 de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21658 nt.
- 15 I-2885 (pMV2(EdB)gp140HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen de gp140 de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21094 nt.
- 20 I-2886 (pMV3(EdB)gp140[delta]V3HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen de gp140ΔV3(ELDKWAS) de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21058 nt.
- 25 I-2887 (pMV2(EdB)-NS1YFV17D) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen NS1 del virus de fiebre amarilla (YFV 17D) insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 20163 nt.
- 30 I-2888 (pMV2(EdB)-EnvYFV17D) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen Env del virus de la fiebre amarilla (YFV 17D) insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 20505 nucleótidos.
- 35 I-3033 (pTM-MVSchw2-Es(WNV)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen de la envuelta secretada, (E) del virus del Nilo Occidental (WNV), insertado en un ATU.
- 40 I-3034 (pTM-MVSchw2-GFPbis) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del GFP insertado en un ATU.
- 45 I-3035 (pTM-MVSchw2-p17p24[delta]myr(HIVB)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del gen gag que codifica proteínas p17p24Δmyr del virus HIVB insertado en un ATU.
- 50 I-3036 (pTMVSchw3-Tat(HIV89-6p)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del gen Tat de la cepa del virus 89.6P insertado en un ATU.
- 55 I-3037 (pTM-MVSchw3-GFP) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del gen GFP insertado en un ATU que tiene una supresión de un nucleótido.
- 60 I-3038 (pTM-MVSchw2-Es) (YFV) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen de la proteína secretada del virus de Fiebre (YFV) insertado en un ATU.
- 65 I-3054 (pTM-MVSchw2-gp140 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp140 [delta] V1 V2 (HIV 89-6) insertado en un ATU.
- I-3055 (pTM-MVSchw2-gp140 [delta] V3 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp140[delta]V3(HIV89-6) insertado en un ATU.

I-3056 (pTM-MVSchw2-gp160 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp160[delta]V1 V2 V3(HIV89-6) insertado en un ATU.

5 I-3057 (pTM-MVSchw2-gp160 [delta] V1 V2 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp160 [delta] V1 V2 (HIV 89-6) insertado en un ATU.

10 I-3058 (pTM-MVSchw2-Gag SIV239 p17-p24 [delta] myr-3-gp140 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica Gag SIV239 p-17-p24 [delta] myr-3-gp140 (HIV89-6) insertado en un ATU.

15 I-3440 (pTM-MVSchw2-[EDIII+M<sup>1-40</sup>]WNV (IS-98-ST1)) es un plásmido obtenido a partir de PTM que contiene la secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz) y una unidad de expresión adicional ubicada entre los genes P y M, conteniendo esta unidad la secuencia de nucleótidos del dominio III de la proteína de envuelta del virus del Nilo Occidental (WNV) (WNV IS-98-ST1) fusionada a la secuencia 1-40 de la proteína de membrana M.

20 I-3442 (pTM-MvSchw2-[EDIII+ApoptoM] DV1 (FGA89)) es un plásmido obtenido a partir de PTM que contiene la secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz) y una unidad de expresión adicional ubicada entre los genes P y M, conteniendo esta unidad la secuencia de nucleótidos del dominio III de la proteína de envuelta del virus de dengue-1 (cepa FGA89) fusionada a una secuencia apoptótica de la proteína de membrana M.

25 I-3441 (pTM-MvSchw2-[EDIII] JEV (Nakayama)) es un plásmido obtenido a partir de PTM que contiene la secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz) y una unidad de expresión adicional ubicada entre los genes P y M, conteniendo esta unidad la secuencia de nucleótidos del dominio III de la proteína de envuelta del virus de encefalitis japonesa (JEV), cepa Nakayama.

30 En una realización particular, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que se obtiene a partir de un antígeno del Virus de Fiebre Amarilla seleccionado entre la envuelta (Env), las proteínas NS2 o mutantes inmunogénicos del mismo. Cuando la secuencia de ADN heteróloga presente en el virus de sarampión recombinante de la invención se obtiene a partir del Virus de Fiebre Amarilla (YFV), el mismo se selecciona provechosamente entre YFV 17D 204 comercializado por Aventis Pasteur bajo la marca Stamaril®.

35 En otra realización particular, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que se obtiene a partir de un antígeno del Virus del Nilo Occidental seleccionado entre la envuelta (E), la pre-membrana (preM) o los mutantes inmunogénicos de los mismos. Cuando la secuencia de ADN heteróloga presente en el virus de sarampión recombinante de la invención se obtiene a partir del Virus del Nilo Occidental (WNV), el mismo se selecciona provechosamente entre la cepa neurovirulenta IS 98-ST1.

40 El ácido nucleico heterólogo puede codificar un antígeno específico tumoral (TSA) o un antígeno relacionado con el tumor (TAA).

45 Otra ventaja de la invención es la posibilidad de insertar en el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, ácido nucleico heterólogo largo o un gran número de ácidos nucleicos heterólogos. De esta manera, el clon de ADNc puede modificarse por inserción de uno o varios ácidos heterólogos cuya secuencia total es de al menos 5 kb.

50 La solicitud también describe métodos para producir células recombinantes que expresan de manera estable las tres o al menos las tres siguientes proteínas, una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos, que comprenden o consisten en:

- 55 a. una célula recombinante con al menos:
- 60 - un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa,
- un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
- 65 - un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido

nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y

b. seleccionar las células que producen de manera estable al menos una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos.

o

a. recombinar una célula con al menos un vector de expresión que comprende:

- al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa bajo el control de un promotor.

- al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de un promotor,

- al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de un promotor y

- un ADN solapado y

b. seleccionar las células que producen de manera estable al menos una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos.

El método para producir células recombinantes descrito en el presente documento comprende adicionalmente recombinar las células recombinantes en la etapa a. del método anterior con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) o un derivado funcional de la misma de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y seleccionar las células que producen de manera estable al menos una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y que producen una proteína larga (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismo.

Las células recombinantes de la invención, como se describe en la presente memoria descriptiva, también se pueden usar como células auxiliares, especialmente como células auxiliares en la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infecciosos, recombinantes.

Realizaciones y características adicionales de la invención definida se encuentran en los siguientes ejemplos y figuras.

### Ejemplos

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

### Células y virus

Células Vero (riñón de mono verde africano) se cultivaron como monocapas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 5% (FCS). Células de riñón humano 293 (HEK-293) se cultivaron en DMEM complementado con FCS al 10%. Células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) se prepararon de la siguiente forma: huevos de pollo fertilizados (Morizeau, Dangers, Francia) se incubaron a 38° C durante 9 días. Los embriones se recogieron en condiciones estériles. La cabeza, los miembros y las vísceras se retiraron y los embriones se cortaron y después se trataron con tripsina durante 5-10 minutos a 37° C (Tripsina/EDTA 2,5 g/l). Después de filtración (70 µm) y varios lavados en DMEM con alto contenido de glucosa/FCS al 10%, las células se sembraron (5-7 106 células por placa de Petri) y se incubaron durante una noche a 37° C antes del uso para infección con virus.

### Construcciones de plásmido

Para permitir la fácil recombinación de secuencias adicionales utilizando el sistema de recombinación Gateway® (Invitrogen), el casete Gateway® (attb1/attb Seq) se introdujo por ligamiento en el vector de plásmido HIV-1-TRIPΔU3-BSX (Zennou y col., 2000) linealizado mediante digestión con *Sma*I. El gen de ARN polimerasa de T7 se amplificó a partir del plásmido pAR-1173 (Brookhaven National Laboratory, ref) por PCR utilizando ADN polimerasa

*PfuTurbo* (Stratagene) y los siguientes cebadores que contienen las secuencias de recombinación Gateway® (subrayado):

AttB1-T7Pol : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGG

AATTCTCTGACATCGAACTGGCT-3'

AttB2-retourT7Pol : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATCAC

GCGAACGCGAAGTCCGACTCTAAGATGTC-3'

5 Una forma nuclear de ARN polimerasa de T7 (nlsT7) también se amplificó a partir del plásmido pAR-3288 (Brookhaven National Laboratory, ref) utilizando los siguientes cebadores que contienen una señal de localización nuclear (en negrita) y las secuencias de recombinación Gateway® (subrayadas):

AttBI-SV40nls : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATG

GCACCAAAAAAGAAGAGAAAGGTA-3'

AttB2-retourT7Pol: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATCACG

CGAACGCGAAGTCCGACTCTAAGATGTC-3'

10 Utilizando el mismo enfoque, los genes N y P de Schwarz MV se amplificaron por PCR a partir del plásmido pTM-MCSchw, que contiene un antígenoma Schwarz MV infeccioso de longitud completa (Combredet y col., 2003). Se utilizaron los siguientes cebadores que contienen las secuencias de recombinación Gateway® (subrayadas):

AttB1-N : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCCACAC

TTTTAAGGAGCTTAGCA-3'

AttB2-N : 5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTGTACTAGTCTAG

AAGATTTCTGTCATTGTA-3'

AttB1-P : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCAGAAG

AGCAGGCACGCCAT-3'

AttB2-P: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTACTACTTCAT

TATTATCTTCATCAGCATCTGGTGGA-3'

20 Los diferentes fragmentos de PCR que codifican la ARN polimerasa de T7, la ARN polimerasa de nlsT7 y las proteínas N y P de MV se introdujeron posteriormente en el plásmido de entrada pDONR™207 (Invitrogen) y recombinaron en el plásmido HIV-1-TRIP-ΔU3-BSX utilizando el sistema de recombinación Gateway® (Invitrogen). Los plásmidos de vector recombinante diferentes obtenidos (HIV-1-TRIP delta U3.CMV-T7, HIV-1-TRIP delta U3.CMV-nlsT7, HIV-1-TRIP delta U3.CMV-N y HIV-1-TRIP delta U3.CMV-P) se secuenciaron completamente. Estos vectores se depositaron en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con los números I-3702, I-3703, I-3700 e I-3701 respectivamente.

30 El plásmido pEMC-LSchw que expresa la proteína de polimerasa larga (L) a partir de Schwarz MV se construyó de manera similar a como se describe en Radecke y col. (1995). La secuencia de 6552 nucleótidos de largo del gen Schwarz L se tomó del plásmido pTM-MV Schw (Combredet y col., 2003) y se insertó en el plásmido pEMC-La descrito previamente en Radecke y col (1995), utilizando procedimientos clásicos de clonación.

#### Producción de partículas de vector

35 Las partículas de vector se produjeron por co-transfección de células HEK-293 utilizando procedimiento de calcio-fosfato con los plásmidos de vector HIV-1-TRIP delta U3.CMV-T7, HIV-1-TRIP delta U3.CMV-nlsT7, HIV-1-TRIP delta U3.CMV-N, o HIV-1-TRIP delta U3.CMV-P, un plásmido de encapsidación que expresa genes *gag* y *pol* de VIH -1 y un plásmido que expresa la glicoproteína de envuelta VSV-G (pHCMV-G) como se describe en (Zennou y col., 2000). La cantidad de antígeno Gag p24 en reservas de partículas de vector concentradas por ultracentrifugación se determinó utilizando ELISA de p24 de VIH-1 (Perkin Elmer LifeSciences).

#### Generación de líneas de células 293-T7-MV

45 Las células (HEK-293) se sembraron en pocillos de 35 mm un día antes de la transducción por vectores lentivirales TRIP-T7 y TRIP-nlsT7. Los vectores (500 ng/ml p24) se agregaron en DMEM complementado con FCS al 10%. Durante 8 días, la misma cantidad de vector se agregó repetidamente cada día sobre las células. Las células se expandieron cada dos días. Después de cada pasaje, se determinó la actividad de la ARN polimerasa de T7 de las

células. Un cultivo celular de 35 mm se transfectó con 5 µg de pEMC-LUC utilizando el procedimiento de calcio-fosfato y la actividad de luciferasa en 1/20 del lisado de células aclarado recolectado un día después de la transfección se midió en un luminómetro. La actividad de luciferasa aumentó después de cada transducción adicional y permaneció máxima entre la séptima y octava transducción. La ausencia de citotoxicidad de la expresión de ARN polimerasa de T7 se demostró después de cada transducción cuantificando la viabilidad celular utilizando el método de exclusión con azul de tripano y comparación con células no transducidas. Después de 8 etapas de transducción, se generaron dos poblaciones celulares con una actividad de ARN polimerasa de T7 muy alta, bien citoplasmática (293-T7) o nuclear (293-nlsT7).

Las dos poblaciones celulares (293-T7 y 293-nlsT7) se sometieron a co-transducción posteriormente simultáneamente por los vectores TRIP-N y TRIP-P. Los vectores (TRIP N: 390 ng/ml p24 y TRIP P: 330 ng/ml p24) se agregaron a células sembradas en pocillos de 35 mm. Durante 10 días, la misma cantidad de ambos vectores se agregó repetidamente cada día en las células. Las células se expandieron cada dos días. Después de 10 rondas de transducción, la expresión de las proteínas N y P de MV se analizó en las poblaciones celulares totales mediante transferencia de western usando 1/20 del lisado total de un pocillo de 35 mm. La expresión de ambas proteínas fue comparable con la del número similar de células Vero infectadas (Figura 2). Las células transducidas se clonaron posteriormente por dilución limitante. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una dilución de 1/3 célula por pocillo. Después de dos semanas, se seleccionaron los primeros clones. Aproximadamente 100 clones de cada una de las células 293-T7-NP y 293-nlsT7-NP se expandieron a placas de 24 pocillos, después a pocillos de 35 mm. La expresión de las proteínas N y P de MV se analizó en 20 clones por transferencia de western utilizando 1/20 del lisado total de un pocillo de 35 mm. La expresión de ambas proteínas fue comparable a la del número similar de células Vero infectadas (Figura 2). La actividad de ARN polimerasa de T7 se midió para cada clon como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron varios clones con una actividad de luciferasa muy alta y un nivel similar de expresión de N y P de MV. Los clones, enumerados a continuación, se amplificaron y congelaron a -180° C en DMEM/FCS al 30%/DMSO al 10% con una densidad de 10<sup>7</sup> células/ml: 293-T7-NP1, 293-T7-NP3, 293-T7-NP5, 293-T7-NP7, 293-T7-NP8, 293-T7-NP10, 293-T7-NP13, 293-T7-NP14, 293-T7-NP20, 293-T7-NP28, 293-T7-NP31, 293-T7-NP33, 293-nlsT7-NP1, 293-nlsT7-NP5, 293-nlsT7-NP6, 293-nlsT7-NP13, 293-nlsT7-NP14, 293-nlsT7-NP15, 293-nlsT7-NP30 y 293-nlsT7-NP40.

### 30 **Rescate de Schwarz MV utilizando células auxiliares 293-T7-NP Y 293-NLST7-NP**

Para evaluar la capacidad de diferentes clones de células auxiliares 293-T7-NP y 293-nlsT7-NP generados de rescatar eficazmente MV a partir de ADNc, se usó el plásmido pTM-MV Schw-eGFP (CombreDET y col., 2003) para rescatar un Schwarz MV recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (eGFP). Se usó un sistema similar al que se ha descrito anteriormente (Radecke y col., Park y col., 1999; CombreDET y col., 2003). Las células auxiliares 293-T7-NP o 293-nlsT7-NP se transfectaron utilizando el procedimiento de calcio fosfato con pTM-MV Schw-eGFP (5 µg) y el plásmido pEMC-L Schw que expresa el gen de polimerasa (L) Schwarz MV (20-100 ng). Después de incubación durante una noche a 37° C, el medio de transfección se reemplazó con medio fresco y las células se sometieron a choque térmico a 43° C durante 3 horas, después se regresaron a 37° C (22). Después de dos días de incubación a 37° C, las células transfectadas se transfirieron a monocapas de células Vero, CEF o MRC5 y se incubaron a 37° C en placas de 10 cm, excepto para CEF, las cuales se incubaron a 32° C. Las células fluorescentes aparecieron rápidamente después de 2-3 días de co-cultivo en células Vero, CEF o MRC5. Las células infectadas se expandieron rápidamente en focos. El virus recombinante fue altamente sincitial en células Vero y no sincitial en células CEF y MRC5. Los sincitios únicos o focos infecciosos se transfirieron a pocillos de 35 mm de células Vero, CEF o MRC5, después se expandieron a placas más grandes agregando células frescas. El virus se recogió a partir de las células CEF o MRC5 después de 5 días de infección y a partir de las células Vero cuando los sincitios implicaron el 80-90% del cultivo (habitualmente después de 2 días) mediante el raspado de las células infectadas, la congelación-descongelación de las células y el medio y la centrifugación para remover los desechos celulares. Tales producciones virales se titularon utilizando el método de titulación TCID<sub>50</sub>. Brevemente, las células Vero se sembraron en placa de 96 pocillos (7500 células/pocillo) y se infectaron mediante diluciones en serie 1:10 de muestra de virus en DMEM/FCS al 5%. Después de la incubación a 37° C durante 7 días, las células se tiñeron con violeta cristal y se determinó la dilución del virus que dio como resultado infección en el 50% de la unidad de ensayo. El punto final del 50% descrito como dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID<sub>50</sub>) se calculó por el método Kräber (3). El virus recombinante rescatado y cultivado en células Vero tuvo títulos de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml y el virus rescatado y cultivado en células CEF o MRC5 tuvo títulos más bajos de 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

La invención proporciona la tecnología para la construcción y producción de vectores recombinantes, especialmente vectores lentivirales del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)-TRIP, que expresa la ARN polimerasa de T7 y proteínas N y P Schwarz de sarampión bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Estos vectores pueden utilizarse para transducir eficazmente *in vitro* casi todas las células en un nivel alto, particularmente células humanas o de mamífero. Tales células pueden utilizarse como células auxiliares/transcomplementarias capaces de generar virus de sarampión recombinantes *de novo* después de la transfección por ADNc antígenómico viral infeccioso de longitud completa o por clones de ADN como se ha definido anteriormente.

La presente invención permite rescatar cualquier virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tal como virus de sarampión, a partir de ADNc, opcionalmente modificado, sin contaminación por cualquier otro virus

auxiliar tal como virus vaccinia. Debido a la alta eficacia de transducción de vectores lentivirales, este método permite generar células que expresan un nivel muy alto de proteínas auxiliares. Debido a que la recombinación basada en retrovirus, particularmente la recombinación basada en lentiviral, de ADN extraño en ADN cromosómico es genuina en comparación con la recombinación basada en plásmido ilícita, las células auxiliares generadas por este método son muy estables y su alta eficacia para rescatar los virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada a partir del ADNc se mantiene después de múltiples pasajes en serie.

### Bibliografía

- 10 Arnebon, P., G. Biberfeld, M. Forsgren y L. V. von Stedingk. 1983. Specific and non-specific B cell activation in measles and varicella. *Clin Exp Immunol* 51: 165-72.
- Baron, M. D. y T. Barrett. 1997. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J Virol* 71 :1265-71.
- 15 Buchholz, U. J., H. Granzow, K. Schuldt, S. S. Whitehead, B. R. Murphy y P. L. Collins. 2000. Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. *J Virol* 74:1187-99.
- 20 C.D.C. 2005. Progress in reducing measles mortality-worldwide, 1999-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 54:200-203.
- Calain, P., and L. Roux. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67:4822-30.
- 25 Clarke, D. K., M. S. Sidhu, J. E. Johnson y S. A. Udem. 2000. Rescue of mumps virus from cDNA. *J Virol* 74:4831-8.
- Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock, y B.R. Murphy. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:11563-7.
- 30 Combredet, C, V. Labrousse-Najburg, L. Mollet, C. Lorin, F. Delebecque, B. Hurtrel, H. McClure, M. Feinberg, M. Brahic y F. Tangy. 2003. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgénic mice. *Journal of Virology* 77:11546-11554.
- Das, S. C, M. D. Baron y T. Barrett. 2000. Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of peste-des-petits-ruminants virus: homologous F and H proteins are required for virus viability. *J Virol* 74:9039-47.
- 40 Durbin, A. P., S. L. Hall, J. W. Siew, S. S. Whitehead, P. L. Collins, and B.R. Murphy. 1997. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* 235:323-32.
- 45 Enders, J. F. y T. C. Peebles. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:277-286.
- Finke, S. y K. K. Conzelmann. 1999. Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. *J Virol* 73:3818-25.
- 50 Fujii, Y., T. Sakaguchi, K. Kiyotani, C. Huang, N. Fukuhara, Y. Egi, y T. Yoshida. 2002. Involvement of the leader sequence in Sendai virus pathogenesis revealed by recovery of a pathogenic field isolate from cDNA. *J Virol* 76:8540-7.
- 55 Garcin, D., P. Latorre, y D. Kolakofsky. 1999. Sendai virus C proteins counteract the interferon-mediated induction of an antiviral state. *J Virol* 73:6559-65.
- Gassen, U., F. M. Collins, W. P. Duprex y B. K. Rima. 2000. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *J Virol* 74:10737-44.
- 60 Griffin, D. 2001. Measles virus, págs. 1401-1441. En D. Knipe y P. Howley (ed.), *Field's Virology*, 4ª Edición, vol. 2. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
- 65 Harty, R. N., M. E. Brown, F. P. Hayes, N. T. Wright y M. J. Schnell. 2001. Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:513-7.

- He, B., R. G. Paterson, C. D. Ward y R. A. Lamb. 1997. Recovery of infectious SV5 from cloned DNA and expression of a foreign gene. *Virology* 237:249-60.
- 5 Hilleman, M. 2002. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* 20:651-665.
- Hoffman, M. A. y A. K. Banerjee. 1997. An infectious clone of human parainfluenza virus type 3. *J Virol* 71 :4272-7.
- 10 Ito, N., M. Takayama, K. Yamada, M. Sugiyama y N. Minamoto. 2001. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *J Virol* 75:9121-8.
- 15 Kato, A., Y. Sakai, T. Shioda, T. Kondo, M. Nakanishi, e Y. Nagai. 1996. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* 1: 569-79.
- Kawano, M., M. Kaito, Y. Kozuka, H. Komada, N. Noda, K. Nanba, M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio e Y. Ito. 2001. Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain. *Virology* 284:99- 112.
- 20 Kim, E. A., K. S. Lee, S. L. Primack, H. K. Yoon, H. S. Byun, T. S. Kim, G. Y. Suh, O. J. Kwon y J. Han. 2002. Viral pneumonias in adults: radiologic and pathologic findings. *Radiographics* 22 Spec N° S137-49.
- 25 Lawson, N. D., E. A. Stillman, M. A. Whitt, y J. K. Rose. 1995. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:4477-81.
- Leyrer, S., W. J. Neubert, y R. Sedlmeier. 1998. Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J Virol Methods* 75:47-58.
- 30 Okada, H., F. Kobune, T. A. Sato, T. Kohama, Y. Takeuchi, T. Abe, N. Takayama, T. Tsuchiya y M. Tashiro. 2000. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 145:905-20.
- 35 Okada, H., T. A. Sato, A. Katayama, K. Higuchi, K. Shichijo, T. Tsuchiya, N. Takayama, Y. Takeuchi, T. Abe, N. Okabe y M. Tashiro. 2001. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146:859-74.
- Ovsyannikova, I., N. Dhiman, R. Jacobson, R. Vierkant y G. Poland. 2003. Frequency of measles virus-specific CD4+ and CD8+ T cells in subjects seronegative or highly seropositive for measles vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:411-416.
- 40 Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, M. S. Sidhu, y S. A. Udem. 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol* 73:3560-6.
- 45 Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu y S. A. Udem. 2001a. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75:921-33.
- Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu y S. A. Udem. 2001 b. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75:910-20.
- 50 Peeters, B. P., O. S. de Leeuw, G. Koch y A. L. Gielkens. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73:5001-9.
- Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen, y M. A. Billeter. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo J* 14:5773-84.
- 55 Romer-Oberdorfer, A., E. Mundt, T. Mebatsion, U. J. Buchholz y T. C. Mettenleiter. 1999. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol* 80 (Pt 11 ):2987-95.
- 60 Schmidt, A. C, J. M. McAuliffe, A. Huang, S. R. Surman, J. E. Bailly, W. R. Elkins, P. L. Collins, B. R. Murphy, y M. H. Skidopoulos. 2000. Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates. *J Virol* 74:8922-9.
- 65 Schneider, H., P. Spielhofer, K. Kaelin, C. Dotsch, F. Radecke, G. Sutter y M. A. Billeter. 1997. Rescue of measles virus using a replication- deficient vaccinia-T7 vector. *J Virol Methods* 64:57-64.

- Schnell, M. J., L. Buonocore, E. Kretzschmar, E. Johnson, y J. K. Rose. 1996. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93:11359-65.
- 5 Schnell, M. J., T. Mebatsion, y K. K. Conzelmann. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J* 13:4195-203.
- Schwarz, A. 1962. Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Am. J. Dis. Child.* 103:216-219.
- 10 Sirven, A., E. Ravet, P. Charneau, V. Zennou, L. Coulombel, D. Guetard, F. Pflumio y A. Dubart-Kupperschmitt. 2001. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCI D mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:438-48.
- 15 Takeda, M., K. Takeuchi, N. Miyajima, F. Kobune, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, Y. Nagai y M. Tashiro. 2000. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J Virol* 74:6643-7.
- Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Muhlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, y H. D. Klenk. 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291 :1965-9.
- 20 Whelan, S. P., L. A. Ball, J. N. Barr y G. T. Wertz. 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92: 8388-92.
- 25 Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier y P. Charneau. 2000. VIH-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101: 173-85.
- Zennou, V., C. Serguera, C. Sarkis, P. Colin, E. Perret, J. Mallet y P. Charneau. 2001. The VIH-1 DNA flap stimulates VIH vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19: 446-50.
- 30



LISTADO DE SECUENCIAS

|    |   |            |
|----|---|------------|
|    | <110> INSTITUT PASTEUR  |            |
| 5  | <120> CÉLULAS Y METODOLOGÍA PARA GENERAR VIRUS DE ARN DE CADENA DE SENTIDO NEGATIVO NO SEGMENTADA |            |
|    | <130> B6773-AD/LV/SDU   |            |
| 10 | <140> EP 06xxxxxx.x<br><141> 22-12-2006   |            |
|    | <160> 25<br><170> PatentIn versión 3.3  |            |
| 15 | <210> 1<br><211> 200<br><212> ADN<br><213> Artificial   |            |
| 20 | <220><br><223> CAEV FLAP  |            |
| 25 | <400> 1   |            |
|    | <b>gttccagcca caatttgtcg ctgtagaatc agccatagca gcagccctag tcgccataaa</b>                          | <b>60</b>  |
|    | <b>tataaaaaga aagggtgggc tggggacaag ccctatggat atttttatat ataataaaga</b>                          | <b>120</b> |
|    | <b>acagaaaaga ataaataata aatataataa aaattctcaa aaaattcaat tctgttatta</b>                          | <b>180</b> |
|    | <b>cagaataagg aaaagaggac</b>  | <b>200</b> |
| 30 | <210> 2<br><211> 200<br><212> ADN<br><213> Artificial   |            |
|    | <220><br><223> EIAV FLAP  |            |
| 35 | <400> 2   |            |
|    | <b>cttgtaacaa agggagggaa agtatgggag gacagacacc atgggaagta tttatcacta</b>                          | <b>60</b>  |
|    | <b>atcaagcaca agtaatacat gagaaacttt tactacagca agcacaatcc tccaaaaaat</b>                          | <b>120</b> |
|    | <b>tttgrrttta caaaatccct ggtgaacatg attggaaggg acctactagg gtgctgtgga</b>                          | <b>180</b> |
|    | <b>agggatgatgg tgcagtagta</b>   | <b>200</b> |
| 40 | <210> 3<br><211> 200<br><212> ADN<br><213> Artificial   |            |
| 45 | <220><br><223> VISNA FLAP   |            |
|    | <400> 3   |            |

ES 2 423 518 T3

|    |   |            |
|----|---|------------|
|    | <b>ggaccctcat tactctaaat ataaaaagaa aggggaggct agggacaagc cctatggata</b>  | <b>60</b>  |
|    | <b>tatttatatt taataaggaa caacaaagaa tacagcaaca aagtaaatca aaacaagaaa</b>  | <b>120</b> |
|    | <b>aaattcgatt ttgttattac agaacaagaa aaagagggca tccaggagag tggcaaggac</b>  | <b>180</b> |
|    | <b>caacacaggt actttggggc</b>  | <b>200</b> |
| 5  | <210> 4<br><211> 200<br><212> ADN<br><213> Artificial                     |            |
| 10 | <220><br><223> SIV AGM FLAP<br><br><400> 4                                |            |
|    | <b>tactgatggc ttgcatactt cacaatttta aaagaaaggg aggaataggg ggacagactt</b>  | <b>60</b>  |
|    | <b>cagcagagag actaattaat ataataacaa cacaattaga aatacaacat ttacaaacca</b>  | <b>120</b> |
|    | <b>aaattcaaaa aattttaaat tttagagtct actacagaga agggagagac cctgtgtgga</b>  | <b>180</b> |
|    | <b>aaggaccggc acaattaatc</b>  | <b>200</b> |
| 15 | <210> 5<br><211> 200<br><212> ADN<br><213> Artificial                     |            |
| 20 | <220><br><223> HIV-2 RID FLAP<br><br><400> 5                              |            |
|    | <b>tgcatgaatt ttaaaagaag ggggggaata ggggatatga ctccatcaga aagattaatc</b>  | <b>60</b>  |
|    | <b>aatatgatca ccacagaaca agagatacaa ttcctccaag ccaaaaattc aaaattaataa</b> | <b>120</b> |
|    | <b>gattttcggg tctatttcag agaaggcaga gatcagttgt ggaaaggacc tggggaacta</b>  | <b>180</b> |
| 25 | <b>ctgtggaaag gagaaggagc</b>  | <b>200</b> |
| 30 | <210> 6<br><211> 200<br><212> ADN<br><213> Artificial                     |            |
| 35 | <220><br><223> HIV-1 LAI FLAP<br><br><400> 6                              |            |
|    | <b>cagtattcat ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg ggggtacagt gcaggggaaa</b>  | <b>60</b>  |
|    | <b>gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaa caaattacaa</b>   | <b>120</b> |
|    | <b>aaattcaaaa ttttcgggtt tattacaggg acagcagaga tccactttgg aaaggaccag</b>  | <b>180</b> |
|    | <b>caaagctcct ctggaaaggt</b>  | <b>200</b> |
| 40 | <210> 7<br><211> 119<br><212> ADN<br><213> Artificial                     |            |

ES 2 423 518 T3

<220>  
<223> HIV-1 FLAP

5 <400> 7

**ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60**  
**agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttc 119**

10 <210> 8  
<211> 2640  
<212> ADN  
<213> Bacteriófago T7

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2640)  
<223> Gen de ARN polimerasa de T7

20 <220>  
<221> CDS  
<222> (10)..(2637)

<400> 8

|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ggctccacc | atg | gaa | ttc | tct | gac | atc | gaa | ctg | gct | gct | atc | ccg | ttc | aac | 51  |     |
|           | Met | Glu | Phe | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Ala | Ala | Ile | Pro | Phe | Asn |     |     |
|           | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |
| act       | ctg | gct | gac | cat | tac | ggt | gag | cgt | tta | gct | cgc | gaa | cag | ttg | gcc | 99  |
| Thr       | Leu | Ala | Asp | His | Tyr | Gly | Glu | Arg | Leu | Ala | Arg | Glu | Gln | Leu | Ala |     |
| 15        |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| ctt       | gag | cat | gag | tct | tac | gag | atg | ggt | gaa | gca | cgc | ttc | cgc | aag | atg | 147 |
| Leu       | Glu | His | Glu | Ser | Tyr | Glu | Met | Gly | Glu | Ala | Arg | Phe | Arg | Lys | Met |     |
|           |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| ttt       | gag | cgt | caa | ctt | aaa | gct | ggt | gag | ggt | gca | gat | aac | gct | gcc | gcc | 195 |
| Phe       | Glu | Arg | Gln | Leu | Lys | Ala | Gly | Glu | Val | Ala | Asp | Asn | Ala | Ala | Ala |     |
|           |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| aag       | cct | ctc | atc | act | acc | cta | ctc | cct | aag | atg | att | gca | cgc | atc | aac | 243 |
| Lys       | Pro | Leu | Ile | Thr | Thr | Leu | Leu | Pro | Lys | Met | Ile | Ala | Arg | Ile | Asn |     |
|           |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     |
| gac       | tgg | ttt | gag | gaa | gtg | aaa | gct | aag | cgc | ggc | aag | cgc | ccg | aca | gcc | 291 |
| Asp       | Trp | Phe | Glu | Glu | Val | Lys | Ala | Lys | Arg | Gly | Lys | Arg | Pro | Thr | Ala |     |
|           | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     |
| ttc       | cag | ttc | ctg | caa | gaa | atc | aag | ccg | gaa | gcc | gta | gca | tac | atc | acc | 339 |
| Phe       | Gln | Phe | Leu | Gln | Glu | Ile | Lys | Pro | Glu | Ala | Val | Ala | Tyr | Ile | Thr |     |
| 95        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |
| att       | aag | acc | act | ctg | gct | tgc | cta | acc | agt | gct | gac | aat | aca | acc | gtt | 387 |
| Ile       | Lys | Thr | Thr | Leu | Ala | Cys | Leu | Thr | Ser | Ala | Asp | Asn | Thr | Thr | Val |     |
|           |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |
| cag       | gct | gta | gca | agc | gca | atc | ggt | cgg | gcc | att | gag | gac | gag | gct | cgc | 435 |
| Gln       | Ala | Val | Ala | Ser | Ala | Ile | Gly | Arg | Ala | Ile | Glu | Asp | Glu | Ala | Arg |     |
|           |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |
| ttc       | ggt | cgt | atc | cgt | gac | ctt | gaa | gct | aag | cac | ttc | aag | aaa | aac | gtt | 483 |
| Phe       | Gly | Arg | Ile | Arg | Asp | Leu | Glu | Ala | Lys | His | Phe | Lys | Lys | Asn | Val |     |
|           |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |
| gag       | gaa | caa | ctc | aac | aag | cgc | gta | ggg | cac | gtc | tac | aag | aaa | gca | ttt | 531 |
| Glu       | Glu | Gln | Leu | Asn | Lys | Arg | Val | Gly | His | Val | Tyr | Lys | Lys | Ala | Phe |     |
|           | 160 |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |
| atg       | caa | ggt | gtc | gag | gct | gac | atg | ctc | tct | aag | ggt | cta | ctc | ggt | ggc | 579 |
| Met       | Gln | Val | Val | Glu | Ala | Asp | Met | Leu | Ser | Lys | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly |     |
| 175       |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |
| gag       | gca | tgg | tct | tcg | tgg | cat | aag | gaa | gac | tct | att | cat | gta | gga | gta | 627 |
| Glu       | Ala | Trp | Ser | Ser | Trp | His | Lys | Glu | Asp | Ser | Ile | His | Val | Gly | Val |     |

ES 2 423 518 T3

|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| cgc | tgc | atc | gag | atg | ctc | att | gag | tca | acc | gga | atg | ggt | agc | tta | cac | 675  |
| Arg | Cys | Ile | Glu | Met | Leu | Ile | Glu | Ser | Thr | Gly | Met | Val | Ser | Leu | His |      |
|     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |      |
| cgc | caa | aat | gct | ggc | gta | gta | ggg | caa | gac | tct | gag | act | atc | gaa | ctc | 723  |
| Arg | Gln | Asn | Ala | Gly | Val | Val | Gly | Gln | Asp | Ser | Glu | Thr | Ile | Glu | Leu |      |
|     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |      |
| gca | cct | gaa | tac | gct | gag | gct | atc | gca | acc | cgt | gca | ggg | gcg | ctg | gct | 771  |
| Ala | Pro | Glu | Tyr | Ala | Glu | Ala | Ile | Ala | Thr | Arg | Ala | Gly | Ala | Leu | Ala |      |
|     | 240 |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |      |
| ggc | atc | tct | ccg | atg | ttc | caa | cct | tgc | gta | ggt | cct | cct | aag | ccg | tgg | 819  |
| Gly | Ile | Ser | Pro | Met | Phe | Gln | Pro | Cys | Val | Val | Pro | Pro | Lys | Pro | Trp |      |
| 255 |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |      |
| act | ggc | att | act | ggg | ggt | ggc | tat | tgg | gct | aac | ggg | cgt | cgt | cct | ctg | 867  |
| Thr | Gly | Ile | Thr | Gly | Gly | Gly | Tyr | Trp | Ala | Asn | Gly | Arg | Arg | Pro | Leu |      |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |      |
| gcg | ctg | gtg | cgt | act | cac | agt | aag | aaa | gca | ctg | atg | cgc | tac | gaa | gac | 915  |
| Ala | Leu | Val | Arg | Thr | His | Ser | Lys | Lys | Ala | Leu | Met | Arg | Tyr | Glu | Asp |      |
|     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |      |
| ggt | tac | atg | cct | gag | gtg | tac | aaa | gcg | att | aac | att | gcg | caa | aac | acc | 963  |
| Val | Tyr | Met | Pro | Glu | Val | Tyr | Lys | Ala | Ile | Asn | Ile | Ala | Gln | Asn | Thr |      |
|     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |      |
| gca | tgg | aaa | atc | aac | aag | aaa | gtc | cta | gcg | gtc | gcc | aac | gta | atc | acc | 1011 |
| Ala | Trp | Lys | Ile | Asn | Lys | Lys | Val | Leu | Ala | Val | Ala | Asn | Val | Ile | Thr |      |
|     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |      |
| aag | tgg | aag | cat | tgt | ccg | gtc | gag | gac | atc | cct | gcg | att | gag | cgt | gaa | 1059 |
| Lys | Trp | Lys | His | Cys | Pro | Val | Glu | Asp | Ile | Pro | Ala | Ile | Glu | Arg | Glu |      |
| 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |      |
| gaa | ctc | ccg | atg | aaa | ccg | gaa | gac | atc | gac | atg | aat | cct | gag | gct | ctc | 1107 |
| Glu | Leu | Pro | Met | Lys | Pro | Glu | Asp | Ile | Asp | Met | Asn | Pro | Glu | Ala | Leu |      |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |      |
| acc | gcg | tgg | aaa | cgt | gct | gcc | gct | gct | gtg | tac | cgc | aag | gac | agg | gct | 1155 |
| Thr | Ala | Trp | Lys | Arg | Ala | Ala | Ala | Ala | Val | Tyr | Arg | Lys | Asp | Arg | Ala |      |
|     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |      |
| cgc | aag | tct | cgc | cgt | atc | agc | ctt | gag | ttc | atg | ctt | gag | caa | gcc | aat | 1203 |
| Arg | Lys | Ser | Arg | Arg | Ile | Ser | Leu | Glu | Phe | Met | Leu | Glu | Gln | Ala | Asn |      |
|     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |      |
| aag | ttt | gct | aac | cat | aag | gcc | atc | tgg | ttc | cct | tac | aac | atg | gac | tgg | 1251 |
| Lys | Phe | Ala | Asn | His | Lys | Ala | Ile | Trp | Phe | Pro | Tyr | Asn | Met | Asp | Trp |      |
|     | 400 |     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |      |
| cgc | ggg | cgt | ggt | tac | gcc | gtg | tca | atg | ttc | aac | ccg | caa | ggg | aac | gat | 1299 |
| Arg | Gly | Arg | Val | Tyr | Ala | Val | Ser | Met | Phe | Asn | Pro | Gln | Gly | Asn | Asp |      |
|     |     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |      |
| atg | acc | aaa | gga | ctg | ctt | acg | ctg | gcg | aaa | ggg | aaa | cca | atc | ggg | aag | 1347 |
| Met | Thr | Lys | Gly | Leu | Leu | Thr | Leu | Ala | Lys | Gly | Lys | Pro | Ile | Gly | Lys |      |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |      |
| gaa | ggg | tac | tac | tgg | ctg | aaa | atc | cac | ggg | gca | aac | tgt | gcg | ggg | gtc | 1395 |
| Glu | Gly | Tyr | Tyr | Trp | Leu | Lys | Ile | His | Gly | Ala | Asn | Cys | Ala | Gly | Val |      |
|     |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |      |
| gat | aag | ggt | ccg | ttc | cct | gag | cgc | atc | aag | ttc | att | gag | gaa | aac | cac | 1443 |
| Asp | Lys | Val | Pro | Phe | Pro | Glu | Arg | Ile | Lys | Phe | Ile | Glu | Glu | Asn | His |      |

ES 2 423 518 T3

| 465               |                   |                   |                   | 470               |                   |                   |                   | 475               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| gag<br>Glu        | aac<br>Asn<br>480 | atc<br>Ile        | atg<br>Met        | gct<br>Ala        | tgc<br>Cys        | gct<br>Ala<br>485 | aag<br>Lys        | tct<br>Ser        | cca<br>Pro        | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu<br>490 | aac<br>Asn        | act<br>Thr        | tgg<br>Trp        | tgg<br>Trp        | 1491 |
| gct<br>Ala<br>495 | gag<br>Glu        | caa<br>Gln        | gat<br>Asp        | tct<br>Ser        | ccg<br>Pro<br>500 | ttc<br>Phe        | tgc<br>Cys        | ttc<br>Phe        | ctt<br>Leu        | gcg<br>Ala<br>505 | ttc<br>Phe        | tgc<br>Cys        | ttt<br>Phe        | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr<br>510 | 1539 |
| gct<br>Ala        | ggg<br>Gly        | gta<br>Val        | cag<br>Gln        | cac<br>His<br>515 | cac<br>His        | ggc<br>Gly        | ctg<br>Leu        | agc<br>Ser        | tat<br>Tyr<br>520 | aac<br>Asn        | tgc<br>Cys        | tcc<br>Ser        | ctt<br>Leu        | ccg<br>Pro<br>525 | ctg<br>Leu        | 1587 |
| gcg<br>Ala        | ttt<br>Phe        | gac<br>Asp        | ggg<br>Gly<br>530 | tct<br>Ser        | tgc<br>Cys        | tct<br>Ser        | ggc<br>Gly        | atc<br>Ile<br>535 | cag<br>Gln        | cac<br>His        | ttc<br>Phe        | tcc<br>Ser        | gcg<br>Ala<br>540 | atg<br>Met        | ctc<br>Leu        | 1635 |
| cga<br>Arg        | gat<br>Asp        | gag<br>Glu<br>545 | gta<br>Val        | ggt<br>Gly        | ggt<br>Gly        | cgc<br>Arg        | gcg<br>Ala<br>550 | gtt<br>Val        | aac<br>Asn        | ttg<br>Leu        | ctt<br>Leu        | cct<br>Pro<br>555 | agt<br>Ser        | gag<br>Glu        | acc<br>Thr        | 1683 |
| gtt<br>Val        | cag<br>Gln<br>560 | gac<br>Asp        | atc<br>Ile        | tac<br>Tyr        | ggg<br>Gly        | att<br>Ile<br>565 | gtt<br>Val        | gct<br>Ala        | aag<br>Lys        | aaa<br>Lys        | gtc<br>Val<br>570 | aac<br>Asn        | gag<br>Glu        | att<br>Ile        | cta<br>Leu        | 1731 |
| caa<br>Gln<br>575 | gca<br>Ala        | gac<br>Asp        | gca<br>Ala        | atc<br>Ile        | aat<br>Asn<br>580 | ggg<br>Gly        | acc<br>Thr        | gat<br>Asp        | aac<br>Asn        | gaa<br>Glu<br>585 | gta<br>Val        | gtt<br>Val        | acc<br>Thr        | gtg<br>Val        | acc<br>Thr<br>590 | 1779 |
| gat<br>Asp        | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        | act<br>Thr        | ggt<br>Gly<br>595 | gaa<br>Glu        | atc<br>Ile        | tct<br>Ser        | gag<br>Glu        | aaa<br>Lys<br>600 | gtc<br>Val        | aag<br>Lys        | ctg<br>Leu        | ggc<br>Gly        | act<br>Thr<br>605 | aag<br>Lys        | 1827 |
| gca<br>Ala        | ctg<br>Leu        | gct<br>Ala        | ggt<br>Gly<br>610 | caa<br>Gln        | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | gct<br>Ala        | cac<br>His<br>615 | ggt<br>Gly        | gtt<br>Val        | act<br>Thr        | cgc<br>Arg        | agt<br>Ser<br>620 | gtg<br>Val        | act<br>Thr        | 1875 |
| aag<br>Lys        | cgt<br>Arg        | tca<br>Ser<br>625 | gtc<br>Val        | atg<br>Met        | acg<br>Thr        | ctg<br>Leu        | gct<br>Ala<br>630 | tac<br>Tyr        | ggg<br>Gly        | tcc<br>Ser        | aaa<br>Lys        | gag<br>Glu<br>635 | ttc<br>Phe        | ggc<br>Gly        | ttc<br>Phe        | 1923 |
| cgt<br>Arg        | caa<br>Gln<br>640 | caa<br>Gln        | gtg<br>Val        | ctg<br>Leu        | gaa<br>Glu        | gat<br>Asp<br>645 | acc<br>Thr        | att<br>Ile        | cag<br>Gln        | cca<br>Pro        | gct<br>Ala<br>650 | att<br>Ile        | gat<br>Asp        | tcc<br>Ser        | ggc<br>Gly        | 1971 |
| aag<br>Lys<br>655 | ggt<br>Gly        | ccg<br>Pro        | atg<br>Met        | ttc<br>Phe        | act<br>Thr<br>660 | cag<br>Gln        | ccg<br>Pro        | aat<br>Asn        | cag<br>Gln        | gct<br>Ala<br>665 | gct<br>Ala        | gga<br>Gly        | tac<br>Tyr        | atg<br>Met        | gct<br>Ala<br>670 | 2019 |
| aag<br>Lys        | ctg<br>Leu        | att<br>Ile        | tgg<br>Trp        | gaa<br>Glu<br>675 | tct<br>Ser        | gtg<br>Val        | agc<br>Ser        | gtg<br>Val        | acg<br>Thr<br>680 | gtg<br>Val        | gta<br>Val        | gct<br>Ala        | gcg<br>Ala        | gtt<br>Val<br>685 | gaa<br>Glu        | 2067 |
| gca<br>Ala        | atg<br>Met        | aac<br>Asn        | tgg<br>Trp<br>690 | ctt<br>Leu        | aag<br>Lys        | tct<br>Ser        | gct<br>Ala        | gct<br>Ala<br>695 | aag<br>Lys        | ctg<br>Leu        | ctg<br>Leu        | gct<br>Ala        | gct<br>Ala<br>700 | gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | 2115 |
| aaa<br>Lys        | gat<br>Asp        | aag<br>Lys<br>705 | aag<br>Lys        | act<br>Thr        | gga<br>Gly        | gag<br>Glu        | att<br>Ile<br>710 | ctt<br>Leu        | cgc<br>Arg        | aag<br>Lys        | cgt<br>Arg        | tgc<br>Cys<br>715 | gct<br>Ala        | gtg<br>Val        | cat<br>His        | 2163 |
| tgg<br>Trp        | gta<br>Val<br>720 | act<br>Thr        | cct<br>Pro        | gat<br>Asp        | ggt<br>Gly        | ttc<br>Phe<br>725 | cct<br>Pro        | gtg<br>Val        | tgg<br>Trp        | cag<br>Gln        | gaa<br>Glu<br>730 | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | aag<br>Lys        | cct<br>Pro        | 2211 |
| att<br>Ile        | cag<br>Gln        | acg<br>Thr        | cgc<br>Arg        | ttg<br>Leu        | aac<br>Asn        | ctg<br>Leu        | atg<br>Met        | ttc<br>Phe        | ctc<br>Leu        | ggt<br>Gly        | cag<br>Gln        | ttc<br>Phe        | cgc<br>Arg        | tta<br>Leu        | cag<br>Gln        | 2259 |

ES 2 423 518 T3

|   |  |                                 |  |                         |  |         |      |
|---|--|---------------------------------|--|-------------------------|--|---------|------|
| 735   |  | 740                             |  | 745                     |  | 750     |      |
| cct acc att aac acc aac aaa gat agc gag att gat gca cac aaa cag |  |                                 |  |                         |  |         | 2307 |
| Pro Thr Ile Asn Thr 755   |  | Asn Lys Asp Ser Glu 760         |  | Ile Asp Ala His Lys 765 |  | Gln     |      |
| gag tct ggt atc gct cct aac ttt gta cac agc caa gac ggt agc cac |  |                                 |  |                         |  |         | 2355 |
| Glu Ser Gly Ile Ala 770   |  | Pro Asn Phe Val 775             |  | His Ser Gln Asp Gly 780 |  | Ser His |      |
| ctt cgt aag act gta gtg tgg gca cac gag aag tac gga atc gaa tct |  |                                 |  |                         |  |         | 2403 |
| Leu Arg Lys Thr Val Val 785                                     |  | Trp Ala His Glu Lys Tyr 790     |  | Gly Ile Glu Ser 795     |  |         |      |
| ttt gca ctg att cac gac tcc ttc ggt acc att ccg gct gac gct gcg |  |                                 |  |                         |  |         | 2451 |
| Phe Ala Leu Ile His Asp 800                                     |  | Ser Phe Gly Thr Ile 805         |  | Pro Ala Asp Ala Ala 810 |  |         |      |
| aac ctg ttc aaa gca gtg cgc gaa act atg gtt gac aca tat gag tct |  |                                 |  |                         |  |         | 2499 |
| Asn Leu Phe Lys Ala Val 815                                     |  | Arg Glu Thr Met Val 820         |  | Asp Thr Tyr Glu Ser 825 |  |         |      |
| tgt gat gta ctg gct gat ttc tac gac cag ttc gct gac cag ttg cac |  |                                 |  |                         |  |         | 2547 |
| Cys Asp Val Leu Ala 835   |  | Asp Phe Tyr Asp Gln Phe Ala 840 |  | Asp Gln Leu His 845     |  |         |      |
| gag tct caa ttg gac aaa atg cca gca ctt ccg gct aaa ggt aac ttg |  |                                 |  |                         |  |         | 2595 |
| Glu Ser Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala 850                         |  | Leu Pro Ala Lys Gly 855         |  | Asn Leu 860             |  |         |      |
| aac ctc cgt gac atc ttá gag tcg gac ttc gcg ttc gcg tga taa     |  |                                 |  |                         |  |         | 2640 |
| Asn Leu Arg Asp Ile Leu 865                                     |  | Glu Ser Asp Phe Ala 870         |  | Phe Ala 875             |  |         |      |

<210> 9  
 <211> 875  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago T7  
 <400> 9

5

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

10

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



Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe  
 385 390 395 400  
 Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly  
 405 410 415  
 Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr  
 420 425 430  
 Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly  
 435 440 445  
 Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys  
 450 455 460  
 Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn  
 465 470 475 480  
 Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu  
 485 490 495  
 Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly  
 500 505 510  
 Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe  
 515 520 525  
 Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp  
 530 535 540  
 Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln  
 545 550 555 560  
 Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala  
 565 570 575  
 Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu  
 580 585 590  
 Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu  
 595 600 605  
 Ala Gly Gln Trp Leu Ala His Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg  
 610 615 620  
 Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln  
 625 630 635 640  
 Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly  
 645 650 655

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

<210> 10  
 <211> 2676  
 <212> ADN  
 <213> Bacteriófago T7

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2676)  
 <223> Gen de ARN polimerasa de nls T7

10

<220>

ES 2 423 518 T3

<221> CDS  
 <222> (10)..(2673)

<400> 10

5

```

ggctccacc atg gca cca aaa aag aag aga aag gta gaa gac ccc aag gaa      51
          Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Glu
           1           5           10

ttc tct gac atc gaa ctg gct gct atc ccg ttc aac act ctg gct gac      99
Phe Ser Asp Ile Glu Leu Ala Ala Ile Pro Phe Asn Thr Leu Ala Asp
15           20           25           30

cat tac ggt gag cgt tta gct cgc gaa cag ttg gcc ctt gag cat gag     147
His Tyr Gly Glu Arg Leu Ala Arg Glu Gln Leu Ala Leu Glu His Glu
           35           40           45

tct tac gag atg ggt gaa gca cgc ttc cgc aag atg ttt gag cgt caa     195
Ser Tyr Glu Met Gly Glu Ala Arg Phe Arg Lys Met Phe Glu Arg Gln
           50           55           60

ctt aaa gct ggt gag gtt gcg gat aac gct gcc gcc aag cct ctc atc     243
Leu Lys Ala Gly Glu Val Ala Asp Asn Ala Ala Ala Lys Pro Leu Ile
           65           70           75

act acc cta ctc cct aag atg att gca cgc atc aac gac tgg ttt gag     291
Thr Thr Leu Leu Pro Lys Met Ile Ala Arg Ile Asn Asp Trp Phe Glu
           80           85           90

gaa gtg aaa gct aag cgc gcc aag cgc ccg aca gcc ttc cag ttc ctg     339
Glu Val Lys Ala Lys Arg Gly Lys Arg Pro Thr Ala Phe Gln Phe Leu
95           100           105           110

caa gaa atc aag ccg gaa gcc gta gcg tac atc acc att aag acc act     387
Gln Glu Ile Lys Pro Glu Ala Val Ala Tyr Ile Thr Ile Lys Thr Thr
           115           120           125

ctg gct tgc cta acc agt gct gac aat aca acc gtt cag gct gta gca     435
Leu Ala Cys Leu Thr Ser Ala Asp Asn Thr Thr Val Gln Ala Val Ala
           130           135           140

agc gca atc ggt cgg gcc att gag gac gag gct cgc ttc ggt cgt atc     483
Ser Ala Ile Gly Arg Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile
           145           150           155

cgt gac ctt gaa gct aag cac ttc aag aaa aac gtt gag gaa caa ctc     531
Arg Asp Leu Glu Ala Lys His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu
           160           165           170

aac aag cgc gta ggg cac gtc tac aag aaa gca ttt atg caa gtt gtc     579
Asn Lys Arg Val Gly His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val
           175           180           185           190

gag gct gac atg ctc tct aag ggt cta ctc ggt gcc gag gcg tgg tct     627
Glu Ala Asp Met Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser
           195           200           205

tcg tgg cat aag gaa gac tct att cat gta gga gta cgc tgc atc gag     675
Ser Trp His Lys Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu
           210           215           220

atg ctc att gag tca acc gga atg gtt agc tta cac cgc caa aat gct     723
Met Leu Ile Glu Ser Thr Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala
           225           230           235

ggc gta gta ggt caa gac tct gag act atc gaa ctc gca cct gaa tac     771
Gly Val Val Gly Gln Asp Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr
    
```

ES 2 423 518 T3

| 240               |                   |                   | 245               |                   |                   | 250               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| gct<br>Ala<br>255 | gag<br>Glu        | gct<br>Ala        | atc<br>Ile        | gca<br>Ala        | acc<br>Thr<br>260 | cgt<br>Arg        | gca<br>Ala        | ggt<br>Gly        | gcg<br>Ala        | ctg<br>Leu<br>265 | gct<br>Ala        | ggc<br>Gly        | atc<br>Ile        | tct<br>Ser        | ccg<br>Pro<br>270 | 819  |
| atg<br>Met        | ttc<br>Phe        | caa<br>Gln        | cct<br>Pro        | tgc<br>Cys<br>275 | gta<br>Val        | gtt<br>Val        | cct<br>Pro        | cct<br>Pro        | aag<br>Lys<br>280 | ccg<br>Pro        | tgg<br>Trp        | act<br>Thr        | ggc<br>Gly        | att<br>Ile<br>285 | act<br>Thr        | 867  |
| ggt<br>Gly        | ggt<br>Gly        | ggc<br>Gly        | tat<br>Tyr<br>290 | tgg<br>Trp        | gct<br>Ala        | aac<br>Asn        | ggt<br>Gly        | cgt<br>Arg<br>295 | cgt<br>Arg        | cct<br>Pro        | ctg<br>Leu        | gcg<br>Ala        | ctg<br>Leu<br>300 | gtg<br>Val        | cgt<br>Arg        | 915  |
| act<br>Thr        | cac<br>His        | agt<br>Ser<br>305 | aag<br>Lys        | aaa<br>Lys        | gca<br>Ala        | ctg<br>Leu        | atg<br>Met<br>310 | cgc<br>Arg        | tac<br>Tyr        | gaa<br>Glu        | gac<br>Asp        | gtt<br>Val<br>315 | tac<br>Tyr        | atg<br>Met        | cct<br>Pro        | 963  |
| gag<br>Glu        | gtg<br>Val<br>320 | tac<br>Tyr        | aaa<br>Lys        | gcg<br>Ala        | att<br>Ile        | aac<br>Asn<br>325 | att<br>Ile        | gcg<br>Ala        | caa<br>Gln        | aac<br>Asn        | acc<br>Thr<br>330 | gca<br>Ala        | tgg<br>Trp        | aaa<br>Lys        | atc<br>Ile        | 1011 |
| aac<br>Asn<br>335 | aag<br>Lys        | aaa<br>Lys        | gtc<br>Val        | cta<br>Leu        | gcg<br>Ala<br>340 | gtc<br>Val        | gcc<br>Ala        | aac<br>Asn        | gta<br>Val        | atc<br>Ile<br>345 | acc<br>Thr        | aag<br>Lys        | tgg<br>Trp        | aag<br>Lys        | cat<br>His<br>350 | 1059 |
| tgt<br>Cys        | ccg<br>Pro        | gtc<br>Val        | gag<br>Glu        | gac<br>Asp<br>355 | atc<br>Ile        | cct<br>Pro        | gcg<br>Ala        | att<br>Ile        | gag<br>Glu<br>360 | cgt<br>Arg        | gaa<br>Glu        | gaa<br>Glu        | ctc<br>Leu        | ccg<br>Pro<br>365 | atg<br>Met        | 1107 |
| aaa<br>Lys        | ccg<br>Pro        | gaa<br>Glu        | gac<br>Asp<br>370 | atc<br>Ile        | gac<br>Asp        | atg<br>Met        | aat<br>Asn        | cct<br>Pro<br>375 | gag<br>Glu        | gct<br>Ala        | ctc<br>Leu        | acc<br>Thr        | gcg<br>Ala<br>380 | tgg<br>Trp        | aaa<br>Lys        | 1155 |
| cgt<br>Arg        | gct<br>Ala        | gcc<br>Ala<br>385 | gct<br>Ala        | gct<br>Ala        | gtg<br>Val        | tac<br>Tyr        | cgc<br>Arg<br>390 | aag<br>Lys        | gac<br>Asp        | agg<br>Arg        | gct<br>Ala        | cgc<br>Arg<br>395 | aag<br>Lys        | tct<br>Ser        | cgc<br>Arg        | 1203 |
| cgt<br>Arg        | atc<br>Ile<br>400 | agc<br>Ser        | ctt<br>Leu        | gag<br>Glu        | ttc<br>Phe        | atg<br>Met<br>405 | ctt<br>Leu        | gag<br>Glu        | caa<br>Gln        | gcc<br>Ala<br>410 | aat<br>Asn        | aag<br>Lys        | ttt<br>Phe        | gct<br>Ala        | aac<br>Asn        | 1251 |
| cat<br>His<br>415 | aag<br>Lys        | gcc<br>Ala        | atc<br>Ile        | tgg<br>Trp        | ttc<br>Phe<br>420 | cct<br>Pro        | tac<br>Tyr        | aac<br>Asn        | atg<br>Met        | gac<br>Asp<br>425 | tgg<br>Trp        | cgc<br>Arg        | ggt<br>Gly        | cgt<br>Arg<br>430 | gtt<br>Val        | 1299 |
| tac<br>Tyr        | gcc<br>Ala        | gtg<br>Val        | tca<br>Ser        | atg<br>Met<br>435 | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | ccg<br>Pro        | caa<br>Gln        | ggt<br>Gly<br>440 | aac<br>Asn        | gat<br>Asp        | atg<br>Met        | acc<br>Thr        | aaa<br>Lys<br>445 | gga<br>Gly        | 1347 |
| ctg<br>Leu        | ctt<br>Leu        | acg<br>Thr        | ctg<br>Leu<br>450 | gcg<br>Ala        | aaa<br>Lys        | ggt<br>Gly        | aaa<br>Lys        | cca<br>Pro<br>455 | atc<br>Ile        | ggt<br>Gly        | aag<br>Lys        | gaa<br>Glu        | ggt<br>Gly<br>460 | tac<br>Tyr        | tac<br>Tyr        | 1395 |
| tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | aaa<br>Lys<br>465 | atc<br>Ile        | cac<br>His        | ggt<br>Gly        | gca<br>Ala        | aac<br>Asn<br>470 | tgt<br>Cys        | gcg<br>Ala        | ggt<br>Gly        | gtc<br>Val        | gat<br>Asp<br>475 | aag<br>Lys        | gtt<br>Val        | ccg<br>Pro        | 1443 |
| ttc<br>Phe        | cct<br>Pro<br>480 | gag<br>Glu        | cgc<br>Arg        | atc<br>Ile        | aag<br>Lys        | ttc<br>Phe<br>485 | att<br>Ile        | gag<br>Glu        | gaa<br>Glu        | aac<br>Asn        | cac<br>His<br>490 | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        | atc<br>Ile        | atg<br>Met        | 1491 |
| gct<br>Ala<br>495 | tgc<br>Cys        | gct<br>Ala        | aag<br>Lys        | tct<br>Ser        | cca<br>Pro<br>500 | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        | act<br>Thr        | tgg<br>Trp<br>505 | tgg<br>Trp        | gct<br>Ala        | gag<br>Glu        | caa<br>Gln        | gat<br>Asp<br>510 | 1539 |
| tct<br>Ser        | ccg<br>Pro        | ttc<br>Phe        | tgc<br>Cys        | ttc<br>Phe        | ctt<br>Leu        | gcg<br>Ala        | ttc<br>Phe        | tgc<br>Cys        | ttt<br>Phe        | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        | gct<br>Ala        | ggg<br>Gly        | gta<br>Val        | cag<br>Gln        | 1587 |

ES 2 423 518 T3

|     |     |     |     |     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |      | 525 |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|--|
| cac | cac | ggc | ctg | agc | tat | aac | tgc | tcc | ctt | ccg | ctg | gcg | ttt | gac | ggg | 1635 |     |  |
| His | His | Gly | Leu | Ser | Tyr | Asn | Cys | Ser | Leu | Pro | Leu | Ala | Phe | Asp | Gly |      |     |  |
|     |     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |     |  |
| tct | tgc | tct | ggc | atc | cag | cac | ttc | tcc | gcg | atg | ctc | cga | gat | gag | gta | 1683 |     |  |
| Ser | Cys | Ser | Gly | Ile | Gln | His | Phe | Ser | Ala | Met | Leu | Arg | Asp | Glu | Val |      |     |  |
|     |     |     | 545 |     |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     |     |      |     |  |
| ggt | ggt | cgc | gcg | gtt | aac | ttg | ctt | cct | agt | gag | acc | gtt | cag | gac | atc | 1731 |     |  |
| Gly | Gly | Arg | Ala | Val | Asn | Leu | Leu | Pro | Ser | Glu | Thr | Val | Gln | Asp | Ile |      |     |  |
|     |     | 560 |     |     | 565 |     |     | 570 |     |     |     |     |     |     |     |      |     |  |
| tac | ggg | att | gtt | gct | aag | aaa | gtc | aac | gag | att | cta | caa | gca | gac | gca | 1779 |     |  |
| Tyr | Gly | Ile | Val | Ala | Lys | Lys | Val | Asn | Glu | Ile | Leu | Gln | Ala | Asp | Ala |      |     |  |
|     |     | 575 |     |     | 580 |     |     | 585 |     |     |     |     |     |     | 590 |      |     |  |
| atc | aat | ggg | acc | gat | aac | gaa | gta | gtt | acc | gtg | acc | gat | gag | aac | act | 1827 |     |  |
| Ile | Asn | Gly | Thr | Asp | Asn | Glu | Val | Val | Thr | Val | Thr | Asp | Glu | Asn | Thr |      |     |  |
|     |     |     |     | 595 |     |     | 600 |     |     |     |     |     |     | 605 |     |      |     |  |
| ggt | gaa | atc | tct | gag | aaa | gtc | aag | ctg | ggc | act | aag | gca | ctg | gct | ggt | 1875 |     |  |
| Gly | Glu | Ile | Ser | Glu | Lys | Val | Lys | Leu | Gly | Thr | Lys | Ala | Leu | Ala | Gly |      |     |  |
|     |     |     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     | 620 |     |     |     |     |      |     |  |
| caa | tgg | ctg | gct | cac | ggt | gtt | act | cgc | agt | gtg | act | aag | cgf | tca | gtc | 1923 |     |  |
| Gln | Trp | Leu | Ala | His | Gly | Val | Thr | Arg | Ser | Val | Thr | Lys | Arg | Ser | Val |      |     |  |
|     |     | 625 |     |     | 630 |     |     | 635 |     |     |     |     |     |     |     |      |     |  |
| atg | acg | ctg | gct | tac | ggg | tcc | aaa | gag | ttc | ggc | ttc | cgf | caa | caa | gtg | 1971 |     |  |
| Met | Thr | Leu | Ala | Tyr | Gly | Ser | Lys | Glu | Phe | Gly | Phe | Arg | Gln | Gln | Val |      |     |  |
|     |     | 640 |     |     | 645 |     |     | 650 |     |     |     |     |     |     |     |      |     |  |
| ctg | gaa | gat | acc | att | cag | cca | gct | att | gat | tcc | ggc | aag | ggt | ccg | atg | 2019 |     |  |
| Leu | Glu | Asp | Thr | Ile | Gln | Pro | Ala | Ile | Asp | Ser | Gly | Lys | Gly | Pro | Met |      |     |  |
|     |     | 655 |     |     | 660 |     |     | 665 |     |     |     |     |     |     | 670 |      |     |  |
| ttc | act | cag | ccg | aat | cag | gct | gct | gga | tac | atg | gct | aag | ctg | att | tgg | 2067 |     |  |
| Phe | Thr | Gln | Pro | Asn | Gln | Ala | Ala | Gly | Tyr | Met | Ala | Lys | Leu | Ile | Trp |      |     |  |
|     |     |     |     | 675 |     |     | 680 |     |     |     |     |     |     | 685 |     |      |     |  |
| gaa | tct | gtg | agc | gtg | acg | gtg | gta | gct | gcg | gtt | gaa | gca | atg | aac | tgg | 2115 |     |  |
| Glu | Ser | Val | Ser | Val | Thr | Val | Val | Ala | Ala | Val | Glu | Ala | Met | Asn | Trp |      |     |  |
|     |     |     | 690 |     |     |     | 695 |     |     |     | 700 |     |     |     |     |      |     |  |
| ctt | aag | tct | gct | gct | aag | ctg | ctg | gct | gct | gag | gtc | aaa | gat | aag | aag | 2163 |     |  |
| Leu | Lys | Ser | Ala | Ala | Lys | Leu | Leu | Ala | Ala | Glu | Val | Lys | Asp | Lys | Lys |      |     |  |
|     |     |     | 705 |     |     |     | 710 |     |     |     | 715 |     |     |     |     |      |     |  |
| act | gga | gag | att | ctt | cgc | aag | cgf | tgc | gct | gtg | cat | tgg | gta | act | cct | 2211 |     |  |
| Thr | Gly | Glu | Ile | Leu | Arg | Lys | Arg | Cys | Ala | Val | His | Trp | Val | Thr | Pro |      |     |  |
|     |     | 720 |     |     | 725 |     |     | 730 |     |     |     |     |     |     |     |      |     |  |
| gat | ggt | ttc | cct | gtg | tgg | cag | gaa | tac | aag | aag | cct | att | cag | acg | cgc | 2259 |     |  |
| Asp | Gly | Phe | Pro | Val | Trp | Gln | Glu | Tyr | Lys | Lys | Pro | Ile | Gln | Thr | Arg |      |     |  |
|     |     | 735 |     |     | 740 |     |     | 745 |     |     |     |     |     |     | 750 |      |     |  |
| ttg | aac | ctg | atg | ttc | ctc | ggt | cag | ttc | cgc | tta | cag | cct | acc | att | aac | 2307 |     |  |
| Leu | Asn | Leu | Met | Phe | Leu | Gly | Gln | Phe | Arg | Leu | Gln | Pro | Thr | Ile | Asn |      |     |  |
|     |     |     |     | 755 |     |     | 760 |     |     |     |     |     |     | 765 |     |      |     |  |
| acc | aac | aaa | gat | agc | gag | att | gat | gca | cac | aaa | cag | gag | tct | ggt | atc | 2355 |     |  |
| Thr | Asn | Lys | Asp | Ser | Glu | Ile | Asp | Ala | His | Lys | Gln | Glu | Ser | Gly | Ile |      |     |  |
|     |     |     | 770 |     |     | 775 |     |     | 780 |     |     |     |     |     |     |      |     |  |
| gct | cct | aac | ttt | gta | cac | agc | caa | gac | ggt | agc | cac | ctt | cgf | aag | act | 2403 |     |  |
| Ala | Pro | Asn | Phe | Val | His | Ser | Gln | Asp | Gly | Ser | His | Leu | Arg | Lys | Thr |      |     |  |

ES 2 423 518 T3

| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| gta | gtg | tgg | gca | cac | gag | aag | tac | gga | atc | gaa | tct | ttt | gca | ctg | att | 2451 |
| Val | Val | Trp | Ala | His | Glu | Lys | Tyr | Gly | Ile | Glu | Ser | Phe | Ala | Leu | Ile |      |
|     | 800 |     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     |      |
| cac | gac | tcc | ttc | ggt | acc | att | ccg | gct | gac | gct | gcg | aac | ctg | ttc | aaa | 2499 |
| His | Asp | Ser | Phe | Gly | Thr | Ile | Pro | Ala | Asp | Ala | Ala | Asn | Leu | Phe | Lys |      |
| 815 |     |     |     | 820 |     |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |      |
| gca | gtg | cgc | gaa | act | atg | gtt | gac | aca | tat | gag | tct | tgt | gat | gta | ctg | 2547 |
| Ala | Val | Arg | Glu | Thr | Met | Val | Asp | Thr | Tyr | Glu | Ser | Cys | Asp | Val | Leu |      |
|     |     |     | 835 |     |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |      |
| gct | gat | ttc | tac | gac | cag | ttc | gct | gac | cag | ttg | cac | gag | tct | caa | ttg | 2595 |
| Ala | Asp | Phe | Tyr | Asp | Gln | Phe | Ala | Asp | Gln | Leu | His | Glu | Ser | Gln | Leu |      |
|     |     | 850 |     |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |      |
| gac | aaa | atg | cca | gca | ctt | ccg | gct | aaa | ggt | aac | ttg | aac | ctc | cgt | gac | 2643 |
| Asp | Lys | Met | Pro | Ala | Leu | Pro | Ala | Lys | Gly | Asn | Leu | Asn | Leu | Arg | Asp |      |
|     |     | 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     |      |
| atc | tta | gag | tcg | gac | ttc | gcg | ttc | gcg | tga | taa |     |     |     |     |     | 2676 |
| Ile | Leu | Glu | Ser | Asp | Phe | Ala | Phe | Ala |     |     |     |     |     |     |     |      |
|     | 880 |     |     |     |     | 885 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

<210> 11  
 <211> 887  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago T7  
 <400> 11

5

ES 2 423 518 T3

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

Ile Gly Arg Ala Ile Glu Asp Glu Ala Arg Phe Gly Arg Ile Arg Asp  
 145 150 155 160

Leu Glu Ala Lys His Phe Lys Lys Asn Val Glu Glu Gln Leu Asn Lys  
 165 170 175

Arg Val Gly His Val Tyr Lys Lys Ala Phe Met Gln Val Val Glu Ala  
 180 185 190

Asp Met Leu Ser Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Ala Trp Ser Ser Trp  
 195 200 205

His Lys Glu Asp Ser Ile His Val Gly Val Arg Cys Ile Glu Met Leu  
 210 215 220

Ile Glu Ser Thr Gly Met Val Ser Leu His Arg Gln Asn Ala Gly Val  
 225 230 235 240

Val Gly Gln Asp Ser Glu Thr Ile Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Glu  
 245 250 255

Ala Ile Ala Thr Arg Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Met Phe  
 260 265 270

Gln Pro Cys Val Val Pro Pro Lys Pro Trp Thr Gly Ile Thr Gly Gly  
 275 280 285

Gly Tyr Trp Ala Asn Gly Arg Arg Pro Leu Ala Leu Val Arg Thr His  
 290 295 300

Ser Lys Lys Ala Leu Met Arg Tyr Glu Asp Val Tyr Met Pro Glu Val  
 305 310 315 320

Tyr Lys Ala Ile Asn Ile Ala Gln Asn Thr Ala Trp Lys Ile Asn Lys  
 325 330 335

Lys Val Leu Ala Val Ala Asn Val Ile Thr Lys Trp Lys His Cys Pro  
 340 345 350

Val Glu Asp Ile Pro Ala Ile Glu Arg Glu Glu Leu Pro Met Lys Pro  
 355 360 365

Glu Asp Ile Asp Met Asn Pro Glu Ala Leu Thr Ala Trp Lys Arg Ala  
 370 375 380

Ala Ala Ala Val Tyr Arg Lys Asp Arg Ala Arg Lys Ser Arg Arg Ile  
 385 390 395 400

Ser Leu Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe Ala Asn His Lys  
 405 410 415



Ala Ile Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly Arg Val Tyr Ala  
 420 425 430

Val Ser Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr Lys Gly Leu Leu  
 435 440 445

Thr Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Trp Leu  
 450 455 460

Lys Ile His Gly Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys Val Pro Phe Pro  
 465 470 475 480

Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn Ile Met Ala Cys  
 485 490 495

Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu Gln Asp Ser Pro  
 500 505 510

Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly Val Gln His His  
 515 520 525

Gly Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe Asp Gly Ser Cys  
 530 535 540

Ser Gly Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp Glu Val Gly Gly  
 545 550 555 560 565

Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln Asp Ile Tyr Gly  
 565 570 575

Ile Val Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Asp Ala Ile Asn  
 580 585 590

Gly Thr Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu  
 595 600 605

Ile Ser Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu Ala Gly Gln Trp  
 610 615 620

Leu Ala His Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg Ser Val Met Thr  
 625 630 635 640

Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln Gln Val Leu Glu  
 645 650 655

Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly Pro Met Phe Thr  
 660 665 670

Gln Pro Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu Ile Trp Glu Ser  
 675 680 685

Val Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys  
 690 695 700  
 Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly  
 705 710 715  
 Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly  
 725 730 735  
 Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn  
 740 745 750  
 Leu Met Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn  
 755 760 765  
 Lys Asp Ser Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro  
 770 775 780  
 Asn Phe Val His Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val  
 785 790 795 800  
 Trp Ala His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp  
 805 810 815  
 Ser Phe Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val  
 820 825 830  
 Arg Glu Thr Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp  
 835 840 845  
 Phe Tyr Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys  
 850 855 860  
 Met Pro Ala Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu  
 865 870 875 880  
 Glu Ser Asp Phe Ala Phe Ala  
 885

5 <210> 12  
 <211> 1578  
 <212> ADN  
 <213> Virus de sarampión

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1578)

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1578)  
 <223> Gen de Schwarz MV N

<400> 12

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |     |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| atg<br>Met<br>1   | gcc<br>Ala        | aca<br>Thr        | ctt<br>Leu        | tta<br>Leu<br>5   | agg<br>Arg        | agc<br>Ser        | tta<br>Leu        | gca<br>Ala        | ttg<br>Leu<br>10  | ttc<br>Phe        | aaa<br>Lys        | aga<br>Arg        | aac<br>Asn        | aag<br>Lys<br>15  | gac<br>Asp        | 48  |
| aaa<br>Lys        | cca<br>Pro        | ccc<br>Pro        | att<br>Ile<br>20  | aca<br>Thr        | tca<br>Ser        | gga<br>Gly        | tcc<br>Ser        | ggt<br>Gly<br>25  | gga<br>Gly        | gcc<br>Ala        | atc<br>Ile        | aga<br>Arg        | gga<br>Gly<br>30  | atc<br>Ile        | aaa<br>Lys        | 96  |
| cac<br>His        | att<br>Ile        | att<br>Ile<br>35  | ata<br>Ile        | gta<br>Val        | cca<br>Pro        | atc<br>Ile        | cct<br>Pro<br>40  | gga<br>Gly        | gat<br>Asp        | tcc<br>Ser        | tca<br>Ser        | att<br>Ile<br>45  | acc<br>Thr        | act<br>Thr        | cga<br>Arg        | 144 |
| tcc<br>Ser        | aga<br>Arg<br>50  | ctt<br>Leu        | ctg<br>Leu        | gac<br>Asp        | cgg<br>Arg        | ttg<br>Leu<br>55  | gtg<br>Val        | agg<br>Arg        | tta<br>Leu        | att<br>Ile        | gga<br>Gly<br>60  | aac<br>Asn        | ccg<br>Pro        | gat<br>Asp        | gtg<br>Val        | 192 |
| agc<br>Ser<br>65  | ggg<br>Gly        | ccc<br>Pro        | aaa<br>Lys        | cta<br>Leu        | aca<br>Thr<br>70  | ggg<br>Gly        | gca<br>Ala        | cta<br>Leu        | ata<br>Ile        | ggt<br>Gly<br>75  | ata<br>Ile        | tta<br>Leu        | tcc<br>Ser        | tta<br>Leu        | ttt<br>Phe<br>80  | 240 |
| gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | tct<br>Ser        | cca<br>Pro        | ggt<br>Gly<br>85  | caa<br>Gln        | ttg<br>Leu        | att<br>Ile        | cag<br>Gln        | agg<br>Arg<br>90  | atc<br>Ile        | acc<br>Thr        | gat<br>Asp        | gac<br>Asp        | cct<br>Pro<br>95  | gac<br>Asp        | 288 |
| gtt<br>Val        | agc<br>Ser        | ata<br>Ile        | agg<br>Arg<br>100 | ctg<br>Leu        | tta<br>Leu        | gag<br>Glu        | gtt<br>Val        | gtc<br>Val<br>105 | cag<br>Gln        | agt<br>Ser        | gac<br>Asp        | cag<br>Gln        | tca<br>Ser<br>110 | caa<br>Gln        | tct<br>Ser        | 336 |
| ggc<br>Gly        | ctt<br>Leu        | acc<br>Thr<br>115 | ttc<br>Phe        | gca<br>Ala        | tca<br>Ser        | aga<br>Arg        | ggt<br>Gly<br>120 | acc<br>Thr        | aac<br>Asn        | atg<br>Met        | gag<br>Glu        | gat<br>Asp<br>125 | gag<br>Glu        | gcg<br>Ala        | gac<br>Asp        | 384 |
| caa<br>Gln<br>130 | tac<br>Tyr        | ttt<br>Phe        | tca<br>Ser        | cat<br>His        | gat<br>Asp        | gat<br>Asp<br>135 | cca<br>Pro        | att<br>Ile        | agt<br>Ser        | agt<br>Ser        | gat<br>Asp<br>140 | caa<br>Gln        | tcc<br>Ser        | agg<br>Arg        | ttc<br>Phe        | 432 |
| gga<br>Gly<br>145 | tgg<br>Trp        | ttc<br>Phe        | ggg<br>Gly        | aac<br>Asn        | aag<br>Lys<br>150 | gaa<br>Glu        | atc<br>Ile        | tca<br>Ser        | gat<br>Asp        | att<br>Ile<br>155 | gaa<br>Glu        | gtg<br>Val        | caa<br>Gln        | gac<br>Asp        | cct<br>Pro<br>160 | 480 |
| gag<br>Glu        | gga<br>Gly        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | atg<br>Met<br>165 | att<br>Ile        | ctg<br>Leu        | ggt<br>Gly        | acc<br>Thr        | atc<br>Ile<br>170 | cta<br>Leu        | gcc<br>Ala        | caa<br>Gln        | att<br>Ile        | tgg<br>Trp<br>175 | gtc<br>Val        | 528 |
| ttg<br>Leu        | ctc<br>Leu        | gca<br>Ala        | aag<br>Lys<br>180 | gcg<br>Ala        | gtt<br>Val        | acg<br>Thr        | gcc<br>Ala        | cca<br>Pro<br>185 | gac<br>Asp        | acg<br>Thr        | gca<br>Ala        | gct<br>Ala        | gat<br>Asp<br>190 | tcg<br>Ser        | gag<br>Glu        | 576 |
| cta<br>Leu        | aga<br>Arg        | agg<br>Arg<br>195 | tgg<br>Trp        | ata<br>Ile        | aag<br>Lys        | tac<br>Tyr        | acc<br>Thr<br>200 | caa<br>Gln        | caa<br>Gln        | aga<br>Arg        | agg<br>Arg        | gta<br>Val<br>205 | gtt<br>Val        | ggt<br>Gly        | gaa<br>Glu        | 624 |
| ttt<br>Phe        | aga<br>Arg<br>210 | ttg<br>Leu        | gag<br>Glu        | aga<br>Arg        | aaa<br>Lys        | tgg<br>Trp<br>215 | ttg<br>Leu        | gat<br>Asp        | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | agg<br>Arg<br>220 | aac<br>Asn        | agg<br>Arg        | att<br>Ile        | gcc<br>Ala        | 672 |
| gag<br>Glu<br>225 | gac<br>Asp        | ctc<br>Leu        | tcc<br>Ser        | tta<br>Leu        | cgc<br>Arg<br>230 | cga<br>Arg        | ttc<br>Phe        | atg<br>Met        | gtc<br>Val        | gct<br>Ala<br>235 | cta<br>Leu        | atc<br>Ile        | ctg<br>Leu        | gat<br>Asp        | atc<br>Ile<br>240 | 720 |
| aag<br>Lys        | aga<br>Arg        | aca<br>Thr        | ccc<br>Pro        | gga<br>Gly<br>245 | aac<br>Asn        | aaa<br>Lys        | ccc<br>Pro        | agg<br>Arg        | att<br>Ile<br>250 | gct<br>Ala        | gaa<br>Glu        | atg<br>Met        | ata<br>Ile        | tgt<br>Cys<br>255 | gac<br>Asp        | 768 |
| att<br>Ile        | gat<br>Asp        | aca<br>Thr        | tat<br>Tyr        | atc<br>Ile        | gta<br>Val        | gag<br>Glu        | gca<br>Ala        | gga<br>Gly        | tta<br>Leu        | gcc<br>Ala        | agt<br>Ser        | ttt<br>Phe        | atc<br>Ile        | ctg<br>Leu        | act<br>Thr        | 816 |

ES 2 423 518 T3

| 260               |                   |                   | 265               |                   |                   | 270               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| att<br>Ile        | aag<br>Lys        | ttt<br>Phe<br>275 | ggg<br>Gly        | ata<br>Ile        | gaa<br>Glu        | act<br>Thr        | atg<br>Met<br>280 | tat<br>Tyr        | cct<br>Pro        | gct<br>Ala        | ctt<br>Leu        | gga<br>Gly<br>285 | ctg<br>Leu        | cat<br>His        | gaa<br>Glu        | 864  |
| ttt<br>Phe        | gct<br>Ala<br>290 | ggt<br>Gly        | gag<br>Glu        | tta<br>Leu        | tcc<br>Ser        | aca<br>Thr<br>295 | ctt<br>Leu        | gag<br>Glu        | tcc<br>Ser        | ttg<br>Leu        | atg<br>Met<br>300 | aac<br>Asn        | ctt<br>Leu        | tac<br>Tyr        | cag<br>Gln        | 912  |
| caa<br>Gln<br>305 | atg<br>Met        | ggg<br>Gly        | gaa<br>Glu        | act<br>Thr        | gca<br>Ala<br>310 | ccc<br>Pro        | tac<br>Tyr        | atg<br>Met        | gta<br>Val        | atc<br>Ile<br>315 | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        | tca<br>Ser        | att<br>Ile<br>320 | 960  |
| cag<br>Gln        | aac<br>Asn        | aag<br>Lys        | ttc<br>Phe        | agt<br>Ser<br>325 | gca<br>Ala        | gga<br>Gly        | tca<br>Ser        | tac<br>Tyr        | cct<br>Pro<br>330 | ctg<br>Leu        | ctc<br>Leu        | tgg<br>Trp        | agc<br>Ser        | tat<br>Tyr<br>335 | gcc<br>Ala        | 1008 |
| atg<br>Met        | gga<br>Gly        | gta<br>Val        | gga<br>Gly<br>340 | gtg<br>Val        | gaa<br>Glu        | ctt<br>Leu        | gaa<br>Glu        | aac<br>Asn<br>345 | tcc<br>Ser        | atg<br>Met        | gga<br>Gly        | ggt<br>Gly        | ttg<br>Leu<br>350 | aac<br>Asn        | ttt<br>Phe        | 1056 |
| ggc<br>Gly        | cga<br>Arg        | tct<br>Ser<br>355 | tac<br>Tyr        | ttt<br>Phe        | gat<br>Asp        | cca<br>Pro        | gca<br>Ala<br>360 | tat<br>Tyr        | ttt<br>Phe        | aga<br>Arg        | tta<br>Leu        | ggg<br>Gly<br>365 | caa<br>Gln        | gag<br>Glu        | atg<br>Met        | 1104 |
| gta<br>Val        | agg<br>Arg<br>370 | agg<br>Arg        | tca<br>Ser        | gct<br>Ala        | gga<br>Gly        | aag<br>Lys<br>375 | gtc<br>Val        | agt<br>Ser        | tcc<br>Ser        | aca<br>Thr        | ttg<br>Leu<br>380 | gca<br>Ala        | tct<br>Ser        | gaa<br>Glu        | ctc<br>Leu        | 1152 |
| ggt<br>Gly<br>385 | atc<br>Ile        | act<br>Thr        | gcc<br>Ala        | gag<br>Glu        | gat<br>Asp<br>390 | gca<br>Ala        | agg<br>Arg        | ctt<br>Leu        | gtt<br>Val        | tca<br>Ser<br>395 | gag<br>Glu        | att<br>Ile        | gca<br>Ala        | atg<br>Met        | cat<br>His<br>400 | 1200 |
| act<br>Thr        | act<br>Thr        | gag<br>Glu        | gac<br>Asp        | aag<br>Lys<br>405 | atc<br>Ile        | agt<br>Ser        | aga<br>Arg        | gcg<br>Ala        | gtt<br>Val<br>410 | gga<br>Gly        | ccc<br>Pro        | aga<br>Arg        | caa<br>Gln        | gcc<br>Ala<br>415 | caa<br>Gln        | 1248 |
| gta<br>Val        | tca<br>Ser        | ttt<br>Phe        | cta<br>Leu<br>420 | cac<br>His        | ggt<br>Gly        | gat<br>Asp        | caa<br>Gln        | agt<br>Ser<br>425 | gag<br>Glu        | aat<br>Asn        | gag<br>Glu        | cta<br>Leu<br>430 | ccg<br>Pro        | aga<br>Arg        | ttg<br>Leu        | 1296 |
| ggg<br>Gly        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys<br>435 | gaa<br>Glu        | gat<br>Asp        | agg<br>Arg        | agg<br>Arg        | gtc<br>Val<br>440 | aaa<br>Lys        | cag<br>Gln        | agt<br>Ser        | cga<br>Arg        | gga<br>Gly<br>445 | gaa<br>Glu        | gcc<br>Ala        | agg<br>Arg        | 1344 |
| gag<br>Glu        | agc<br>Ser<br>450 | tac<br>Tyr        | aga<br>Arg        | gaa<br>Glu        | acc<br>Thr        | ggg<br>Gly<br>455 | ccc<br>Pro        | agc<br>Ser        | aga<br>Arg        | gca<br>Ala        | agt<br>Ser<br>460 | gat<br>Asp        | gcg<br>Ala        | aga<br>Arg        | gct<br>Ala        | 1392 |
| gcc<br>Ala<br>465 | cat<br>His        | ctt<br>Leu        | cca<br>Pro        | acc<br>Thr        | ggc<br>Gly<br>470 | aca<br>Thr        | ccc<br>Pro        | cta<br>Leu        | gac<br>Asp        | att<br>Ile<br>475 | gac<br>Asp        | act<br>Thr        | gca<br>Ala        | acg<br>Thr        | gag<br>Glu<br>480 | 1440 |
| tcc<br>Ser        | agc<br>Ser        | caa<br>Gln        | gat<br>Asp        | ccg<br>Pro<br>485 | cag<br>Gln        | gac<br>Asp        | agt<br>Ser        | cga<br>Arg        | agg<br>Arg<br>490 | tca<br>Ser        | gct<br>Ala        | gac<br>Asp        | gcc<br>Ala        | ctg<br>Leu<br>495 | ctt<br>Leu        | 1488 |
| agg<br>Arg        | ctg<br>Leu        | caa<br>Gln        | gcc<br>Ala<br>500 | atg<br>Met        | gca<br>Ala        | gga<br>Gly        | atc<br>Ile        | tcg<br>Ser<br>505 | gaa<br>Glu        | gaa<br>Glu        | caa<br>Gln        | ggc<br>Gly        | tca<br>Ser<br>510 | gac<br>Asp        | acg<br>Thr        | 1536 |
| gac<br>Asp        | acc<br>Thr        | cct<br>Pro<br>515 | ata<br>Ile        | gtg<br>Val        | tac<br>Tyr        | aat<br>Asn        | gac<br>Asp<br>520 | aga<br>Arg        | aat<br>Asn        | ctt<br>Leu        | cta<br>Leu        | gac<br>Asp<br>525 | tag               |                   |                   | 1578 |

<210> 13  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Virus de sarampión

ES 2 423 518 T3

<400> 13

Met Ala Thr Leu Leu Arg Ser Leu Ala Leu Phe Lys Arg Asn Lys Asp  
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Ile Thr Ser Gly Ser Gly Gly Ala Ile Arg Gly Ile Lys  
 20 25 30

His Ile Ile Ile Val Pro Ile Pro Gly Asp Ser Ser Ile Thr Thr Arg  
 35 40 45

Ser Arg Leu Leu Asp Arg Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Pro Asp Val  
 50 55 60

Ser Gly Pro Lys Leu Thr Gly Ala Leu Ile Gly Ile Leu Ser Leu Phe  
 65 70 75 80

Val Glu Ser Pro Gly Gln Leu Ile Gln Arg Ile Thr Asp Asp Pro Asp  
 85 90 95

Val Ser Ile Arg Leu Leu Glu Val Val Gln Ser Asp Gln Ser Gln Ser  
 100 105 110

Gly Leu Thr Phe Ala Ser Arg Gly Thr Asn Met Glu Asp Glu Ala Asp  
 115 120 125

Gln Tyr Phe Ser His Asp Asp Pro Ile Ser Ser Asp Gln Ser Arg Phe  
 130 135 140

Gly Trp Phe Gly Asn Lys Glu Ile Ser Asp Ile Glu Val Gln Asp Pro  
 145 150 155 160

Glu Gly Phe Asn Met Ile Leu Gly Thr Ile Leu Ala Gln Ile Trp Val  
 165 170 175

Leu Leu Ala Lys Ala Val Thr Ala Pro Asp Thr Ala Ala Asp Ser Glu  
 180 185 190

Leu Arg Arg Trp Ile Lys Tyr Thr Gln Gln Arg Arg Val Val Gly Glu  
 195 200 205

Phe Arg Leu Glu Arg Lys Trp Leu Asp Val Val Arg Asn Arg Ile Ala  
 210 215 220

Glu Asp Leu Ser Leu Arg Arg Phe Met Val Ala Leu Ile Leu Asp Ile  
 225 230 235 240

Lys Arg Thr Pro Gly Asn Lys Pro Arg Ile Ala Glu Met Ile Cys Asp  
 245 250 255

Ile Asp Thr Tyr Ile Val Glu Ala Gly Leu Ala Ser Phe Ile Leu Thr  
 260 265 270

Ile Lys Phe Gly Ile Glu Thr Met Tyr Pro Ala Leu Gly Leu His Glu  
 275 280 285

Phe Ala Gly Glu Leu Ser Thr Leu Glu Ser Leu Met Asn Leu Tyr Gln  
 290 295 300

Gln Met Gly Glu Thr Ala Pro Tyr Met Val Ile Leu Glu Asn Ser Ile  
 305 310 315 320

Gln Asn Lys Phe Ser Ala Gly Ser Tyr Pro Leu Leu Trp Ser Tyr Ala  
 325 330 335

Met Gly Val Gly Val Glu Leu Glu Asn Ser Met Gly Gly Leu Asn Phe  
 340 345 350

Gly Arg Ser Tyr Phe Asp Pro Ala Tyr Phe Arg Leu Gly Gln Glu Met  
 355 360 365

Val Arg Arg Ser Ala Gly Lys Val Ser Ser Thr Leu Ala Ser Glu Leu  
 370 375 380

Gly Ile Thr Ala Glu Asp Ala Arg Leu Val Ser Glu Ile Ala Met His  
 385 390 395 400

Thr Thr Glu Asp Lys Ile Ser Arg Ala Val Gly Pro Arg Gln Ala Gln  
 405 410 415

Val Ser Phe Leu His Gly Asp Gln Ser Glu Asn Glu Leu Pro Arg Leu  
 420 425 430

Gly Gly Lys Glu Asp Arg Arg Val Lys Gln Ser Arg Gly Glu Ala Arg  
 435 440 445

Glu Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Pro Ser Arg Ala Ser Asp Ala Arg Ala  
 450 455 460

Ala His Leu Pro Thr Gly Thr Pro Leu Asp Ile Asp Thr Ala Thr Glu  
 465 470 475 480

Ser Ser Gln Asp Pro Gln Asp Ser Arg Arg Ser Ala Asp Ala Leu Leu  
 485 490 495

Arg Leu Gln Ala Met Ala Gly Ile Ser Glu Glu Gln Gly Ser Asp Thr  
 500 505 510

Asp Thr Pro Ile Val Tyr Asn Asp Arg Asn Leu Leu Asp  
 515 520 525

ES 2 423 518 T3

<211> 1524  
 <212> ADN  
 <213> Virus de sarampión

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1524)

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1524)  
 <223> Gen de Schwarz MV P

15 <400> 14

|   |     |
|---|-----|
| atg gca gaa gag cag gca cgc cat gtc aaa aac gga ctg gaa tgc atc | 48  |
| Met Ala Glu Glu Gln Ala Arg His Val Lys Asn Gly Leu Glu Cys Ile |     |
| 1 5 10 15   |     |
| cgg gct ctc aag gcc gag ccc atc ggc tca ctg gcc atc gag gaa gct | 96  |
| Arg Ala Leu Lys Ala Glu Pro Ile Gly Ser Leu Ala Ile Glu Glu Ala |     |
| 20 25 30  |     |
| atg gca gca tgg tca gaa ata tca gac aac cca gga cag gag cga gcc | 144 |
| Met Ala Ala Trp Ser Glu Ile Ser Asp Asn Pro Gly Gln Glu Arg Ala |     |
| 35 40 45  |     |
| acc tgc agg gaa gag aag gca ggc agt tcg ggt ctc agc aaa cca tgc | 192 |
| Thr Cys Arg Glu Glu Lys Ala Gly Ser Ser Gly Leu Ser Lys Pro Cys |     |
| 50 55 60  |     |
| ctc tca gca att gga tca act gaa ggc ggt gca cct cgc atc cgc ggt | 240 |
| Leu Ser Ala Ile Gly Ser Thr Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ile Arg Gly |     |
| 65 70 75 80   |     |
| cag gga cct gga gag agc gat gac gac gct gaa act ttg gga atc ccc | 288 |
| Gln Gly Pro Gly Glu Ser Asp Asp Asp Ala Glu Thr Leu Gly Ile Pro |     |
| 85 90 95  |     |
| cca aga aat ctc cag gca tca agc act ggg tta cag tgt tat tac gtt | 336 |
| Pro Arg Asn Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val |     |
| 100 105 110   |     |
| tat gat cac agc ggt gaa gcg gtt aag gga atc caa gat gct gac tct | 384 |
| Tyr Asp His Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser |     |
| 115 120 125   |     |
| atc atg gtt caa tca ggc ctt gat ggt gat agc acc ctc tca gga gga | 432 |
| Ile Met Val Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr Leu Ser Gly Gly |     |
| 130 135 140   |     |
| gac aat gaa tct gaa aac agc gat gtg gat att ggc gaa cct gat acc | 480 |
| Asp Asn Glu Ser Glu Asn Ser Asp Val Asp Ile Gly Glu Pro Asp Thr |     |
| 145 150 155 160   |     |
| gag gga tat gct atc act gac cgg gga tct gct ccc atc tct atg ggg | 528 |
| Glu Gly Tyr Ala Ile Thr Asp Arg Gly Ser Ala Pro Ile Ser Met Gly |     |
| 165 170 175   |     |
| ttc agg gct tct gat gtt gaa act gca gaa gga ggg gag atc cac gag | 576 |
| Phe Arg Ala Ser Asp Val Glu Thr Ala Glu Gly Gly Glu Ile His Glu |     |
| 180 185 190   |     |
| ctc ctg aga ctc caa tcc aga ggc aac aac ttt ccg aag ctt ggg aaa | 624 |
| Leu Leu Arg Leu Gln Ser Arg Gly Asn Asn Phe Pro Lys Leu Gly Lys |     |

| 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| act | ctc | aat | ggt | cct | ccg | ccc | ccg | gac | ccc | ggt | agg | gcc | agc | act | tcc | 672  |
| Thr | Leu | Asn | Val | Pro | Pro | Pro | Pro | Asp | Pro | Gly | Arg | Ala | Ser | Thr | Ser |      |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| ggg | aca | ccc | att | aaa | aag | ggc | aca | gac | gcg | aga | tta | gcc | tca | ttt | gga | 720  |
| Gly | Thr | Pro | Ile | Lys | Lys | Gly | Thr | Asp | Ala | Arg | Leu | Ala | Ser | Phe | Gly |      |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| acg | gag | atc | gcg | tct | tta | ttg | aca | ggt | ggt | gca | acc | caa | tgt | gct | cga | 768  |
| Thr | Glu | Ile | Ala | Ser | Leu | Leu | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Gln | Cys | Ala | Arg |      |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| aag | tca | ccc | tcg | gaa | cca | tca | ggg | cca | ggt | gca | cct | gcg | ggg | aat | gtc | 816  |
| Lys | Ser | Pro | Ser | Glu | Pro | Ser | Gly | Pro | Gly | Ala | Pro | Ala | Gly | Asn | Val |      |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| ccc | gag | tgt | gtg | agc | aat | gcc | gca | ctg | ata | cag | gag | tgg | aca | ccc | gaa | 864  |
| Pro | Glu | Cys | Val | Ser | Asn | Ala | Ala | Leu | Ile | Gln | Glu | Trp | Thr | Pro | Glu |      |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| tct | ggt | acc | aca | atc | tcc | ccg | aga | tcc | cag | aat | aat | gaa | gaa | ggg | gga | 912  |
| Ser | Gly | Thr | Thr | Ile | Ser | Pro | Arg | Ser | Gln | Asn | Asn | Glu | Glu | Gly | Gly |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| gac | tat | tat | gat | gat | gag | ctg | ttc | tct | gat | gtc | caa | gat | att | aaa | aca | 960  |
| Asp | Tyr | Tyr | Asp | Asp | Glu | Leu | Phe | Ser | Asp | Val | Gln | Asp | Ile | Lys | Thr |      |
|     |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| gcc | ttg | gcc | aaa | ata | cac | gag | gat | aat | cag | aag | ata | atc | tcc | aag | cta | 1008 |
| Ala | Leu | Ala | Lys | Ile | His | Glu | Asp | Asn | Gln | Lys | Ile | Ile | Ser | Lys | Leu |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| gaa | tca | ctg | ctg | tta | ttg | aag | gga | gaa | ggt | gag | tca | att | aag | aag | cag | 1056 |
| Glu | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | Lys | Gly | Glu | Val | Glu | Ser | Ile | Lys | Lys | Gln |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| atc | aac | agg | caa | aat | atc | agc | ata | tcc | acc | ctg | gaa | gga | cac | ctc | tca | 1104 |
| Ile | Asn | Arg | Gln | Asn | Ile | Ser | Ile | Ser | Thr | Leu | Glu | Gly | His | Leu | Ser |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| agc | atc | atg | atc | gcc | att | cct | gga | ctt | ggg | aag | gat | ccc | aac | gac | ccc | 1152 |
| Ser | Ile | Met | Ile | Ala | Ile | Pro | Gly | Leu | Gly | Lys | Asp | Pro | Asn | Asp | Pro |      |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| act | gca | gat | gtc | gaa | atc | aat | ccc | gac | ttg | aaa | ccc | atc | ata | ggc | aga | 1200 |
| Thr | Ala | Asp | Val | Glu | Ile | Asn | Pro | Asp | Leu | Lys | Pro | Ile | Ile | Gly | Arg |      |
|     |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |
| gat | tca | ggc | cga | gca | ctg | gcc | gaa | ggt | ctc | aag | aaa | ccc | ggt | gcc | agc | 1248 |
| Asp | Ser | Gly | Arg | Ala | Leu | Ala | Glu | Val | Leu | Lys | Lys | Pro | Val | Ala | Ser |      |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |
| cga | caa | ctc | caa | gga | atg | aca | aat | gga | cgg | acc | agt | tcc | aga | gga | cag | 1296 |
| Arg | Gln | Leu | Gln | Gly | Met | Thr | Asn | Gly | Arg | Thr | Ser | Ser | Arg | Gly | Gln |      |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| ctg | ctg | aag | gaa | ttt | cag | cta | aag | ccg | atc | ggg | aaa | aag | atg | agc | tca | 1344 |
| Leu | Leu | Lys | Glu | Phe | Gln | Leu | Lys | Pro | Ile | Gly | Lys | Lys | Met | Ser | Ser |      |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |
| gcc | gtc | ggg | ttt | ggt | cct | gac | acc | ggc | cct | gca | tca | cgc | agt | gta | atc | 1392 |
| Ala | Val | Gly | Phe | Val | Pro | Asp | Thr | Gly | Pro | Ala | Ser | Arg | Ser | Val | Ile |      |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| cgc | tcc | att | ata | aaa | tcc | agc | cgg | cta | gag | gag | gat | cgg | aag | cgt | tac | 1440 |
| Arg | Ser | Ile | Ile | Lys | Ser | Ser | Arg | Leu | Glu | Glu | Asp | Arg | Lys | Arg | Tyr |      |



ES 2 423 518 T3

|   |  |     |  |     |  |     |  |      |
|---|--|-----|--|-----|--|-----|--|------|
| 465   |  | 470 |  | 475 |  | 480 |  |      |
| ctg atg act ctc ctt gat gat atc aaa gga gcc aat gat ctt gcc aag |  |     |  |     |  |     |  | 1488 |
| Leu Met Thr Leu Leu Asp Asp Ile Lys Gly Ala Asn Asp Leu Ala Lys |  |     |  |     |  |     |  |      |
|   |  | 485 |  | 490 |  | 495 |  |      |
| ttc cac cag atg ctg atg aag ata ata atg aag tag                 |  |     |  |     |  |     |  | 1524 |
| Phe His Gln Met Leu Met Lys Ile Ile Met Lys                     |  |     |  |     |  |     |  |      |
|   |  | 500 |  | 505 |  |     |  |      |

<210> 15  
 <211> 507  
 <212> PRT  
 <213> Virus de sarampión  
  
 <400> 15

5

ES 2 423 518 T3

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

Thr Leu Asn Val Pro Pro Pro Asp Pro Gly Arg Ala Ser Thr Ser  
 210 215 220  
 Gly Thr Pro Ile Lys Lys Gly Thr Asp Ala Arg Leu Ala Ser Phe Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Glu Ile Ala Ser Leu Leu Thr Gly Gly Ala Thr Gln Cys Ala Arg  
 245 250 255  
 Lys Ser Pro Ser Glu Pro Ser Gly Pro Gly Ala Pro Ala Gly Asn Val  
 260 265 270  
 Pro Glu Cys Val Ser Asn Ala Ala Leu Ile Gln Glu Trp Thr Pro Glu  
 275 280 285  
 Ser Gly Thr Thr Ile Ser Pro Arg Ser Gln Asn Asn Glu Glu Gly Gly  
 290 295 300  
 Asp Tyr Tyr Asp Asp Glu Leu Phe Ser Asp Val Gln Asp Ile Lys Thr  
 305 310 315 320  
 Ala Leu Ala Lys Ile His Glu Asp Asn Gln Lys Ile Ile Ser Lys Leu  
 325 330 335  
 Glu Ser Leu Leu Leu Lys Gly Glu Val Glu Ser Ile Lys Lys Gln  
 340 345 350  
 Ile Asn Arg Gln Asn Ile Ser Ile Ser Thr Leu Glu Gly His Leu Ser  
 355 360 365  
 Ser Ile Met Ile Ala Ile Pro Gly Leu Gly Lys Asp Pro Asn Asp Pro  
 370 375 380  
 Thr Ala Asp Val Glu Ile Asn Pro Asp Leu Lys Pro Ile Ile Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Gly Arg Ala Leu Ala Glu Val Leu Lys Lys Pro Val Ala Ser  
 405 410 415  
 Arg Gln Leu Gln Gly Met Thr Asn Gly Arg Thr Ser Ser Arg Gly Gln  
 420 425 430  
 Leu Leu Lys Glu Phe Gln Leu Lys Pro Ile Gly Lys Lys Met Ser Ser  
 435 440 445  
 Ala Val Gly Phe Val Pro Asp Thr Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Ile  
 450 455 460  
 Arg Ser Ile Ile Lys Ser Ser Arg Leu Glu Glu Asp Arg Lys Arg Tyr  
 465 470 475 480

ES 2 423 518 T3

Leu Met Thr Leu Leu Asp Asp Ile Lys Gly Ala Asn Asp Leu Ala Lys  
 485 490 495

Phe His Gln Met Leu Met Lys Ile Ile Met Lys  
 500 505

5 <210> 16  
 <211> 6552  
 <212> ADN  
 <213> Virus de sarampión

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(6552)

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(6555)  
 <223> Gen de Schwarz MV L

<400> 16

|   |     |
|---|-----|
| atg gac tcg cta tct gtc aac cag atc tta tac cct gaa gtt cac cta | 48  |
| Met Asp Ser Leu Ser Val Asn Gln Ile Leu Tyr Pro Glu Val His Leu |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gat agc ccg ata gtt acc aat aag ata gta gcc atc ctg gag tat gct | 96  |
| Asp Ser Pro Ile Val Thr Asn Lys Ile Val Ala Ile Leu Glu Tyr Ala |     |
| 20 25 30  |     |
| cga gtc cct cac gct tac agc ctg gag gac cct aca ctg tgt cag aac | 144 |
| Arg Val Pro His Ala Tyr Ser Leu Glu Asp Pro Thr Leu Cys Gln Asn |     |
| 35 40 45  |     |
| atc aag cac cgc cta aaa aac gga ttt tcc aac caa atg att ata aac | 192 |
| Ile Lys His Arg Leu Lys Asn Gly Phe Ser Asn Gln Met Ile Ile Asn |     |
| 50 55 60  |     |
| aat gtg gaa gtt ggg aat gtc atc aag tcc aag ctt agg agt tat ccg | 240 |
| Asn Val Glu Val Gly Asn Val Ile Lys Ser Lys Leu Arg Ser Tyr Pro |     |
| 65 70 75 80   |     |
| gcc cac tct cat att cca tat cca aat tgt aat cag gat tta ttt aac | 288 |
| Ala His Ser His Ile Pro Tyr Pro Asn Cys Asn Gln Asp Leu Phe Asn |     |
| 85 90 95  |     |
| ata gaa gac aaa gag tca acg agg aag atc cgt gaa ctc ctc aaa aag | 336 |
| Ile Glu Asp Lys Glu Ser Thr Arg Lys Ile Arg Glu Leu Leu Lys Lys |     |
| 100 105 110   |     |
| ggg aat tcg ctg tac tcc aaa gtc agt gat aag gtt ttc caa tgc tta | 384 |
| Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Lys Val Ser Asp Lys Val Phe Gln Cys Leu |     |
| 115 120 125   |     |
| agg gac act aac tca cgg ctt ggc cta ggc tcc gaa ttg agg gag gac | 432 |
| Arg Asp Thr Asn Ser Arg Leu Gly Leu Gly Ser Glu Leu Arg Glu Asp |     |
| 130 135 140   |     |
| atc aag gag aaa gtt att aac ttg gga gtt tac atg cac agc tcc cag | 480 |
| Ile Lys Glu Lys Val Ile Asn Leu Gly Val Tyr Met His Ser Ser Gln |     |
| 145 150 155 160   |     |
| tgg ttt gag ccc ttt ctg ttt tgg ttt aca gtc aag act gag atg agg | 528 |
| Trp Phe Glu Pro Phe Leu Phe Trp Phe Thr Val Lys Thr Glu Met Arg |     |

ES 2 423 518 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 165 |     |     | 170 |     |     | 175  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|
| tca | gtg | att | aaa | tca | caa | acc | cat | act | tgc | cat | agg | agg | aga | cac | aca | 576  |  |  |  |
| Ser | Val | Ile | Lys | Ser | Gln | Thr | His | Thr | Cys | His | Arg | Arg | Arg | His | Thr |      |  |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |      |  |  |  |
| cct | gta | ttc | ttc | act | ggt | agt | tca | gtt | gag | ttg | cta | atc | tct | cgt | gac | 624  |  |  |  |
| Pro | Val | Phe | Phe | Thr | Gly | Ser | Ser | Val | Glu | Leu | Leu | Ile | Ser | Arg | Asp |      |  |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |  |  |  |
| ctt | gtt | gct | ata | atc | agt | aaa | gag | tct | caa | cat | gta | tat | tac | ctg | aca | 672  |  |  |  |
| Leu | Val | Ala | Ile | Ile | Ser | Lys | Glu | Ser | Gln | His | Val | Tyr | Tyr | Leu | Thr |      |  |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ttt | gaa | ctg | gtt | ttg | atg | tat | tgt | gat | gtc | ata | gag | ggg | agg | tta | atg | 720  |  |  |  |
| Phe | Glu | Leu | Val | Leu | Met | Tyr | Cys | Asp | Val | Ile | Glu | Gly | Arg | Leu | Met |      |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |  |  |  |
| aca | gag | acc | gct | atg | act | att | gat | gct | agg | tat | aca | gag | ctt | cta | gga | 768  |  |  |  |
| Thr | Glu | Thr | Ala | Met | Thr | Ile | Asp | Ala | Arg | Tyr | Thr | Glu | Leu | Leu | Gly |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |  |  |  |
| aga | gtc | aga | tac | atg | tgg | aaa | ctg | ata | gat | ggt | ttc | ttc | cct | gca | ctc | 816  |  |  |  |
| Arg | Val | Arg | Tyr | Met | Trp | Lys | Leu | Ile | Asp | Gly | Phe | Phe | Pro | Ala | Leu |      |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |  |  |  |
| ggg | aat | cca | act | tat | caa | att | gta | gcc | atg | ctg | gag | cct | ctt | tca | ctt | 864  |  |  |  |
| Gly | Asn | Pro | Thr | Tyr | Gln | Ile | Val | Ala | Met | Leu | Glu | Pro | Leu | Ser | Leu |      |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |  |  |  |
| gct | tac | ctg | cag | ctg | agg | gat | ata | aca | gta | gaa | ctc | aga | ggt | gct | ttc | 912  |  |  |  |
| Ala | Tyr | Leu | Gln | Leu | Arg | Asp | Ile | Thr | Val | Glu | Leu | Arg | Gly | Ala | Phe |      |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ctt | aac | cac | tgc | ttt | act | gaa | ata | cat | gat | gtt | ctt | gac | caa | aac | ggg | 960  |  |  |  |
| Leu | Asn | His | Cys | Phe | Thr | Glu | Ile | His | Asp | Val | Leu | Asp | Gln | Asn | Gly |      |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |  |  |  |
| ttt | tct | gat | gaa | ggt | act | tat | cat | gag | tta | act | gaa | gct | cta | gat | tac | 1008 |  |  |  |
| Phe | Ser | Asp | Glu | Gly | Thr | Tyr | His | Glu | Leu | Thr | Glu | Ala | Leu | Asp | Tyr |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |  |  |  |
| att | ttc | ata | act | gat | gac | ata | cat | ctg | aca | ggg | gag | att | ttc | tca | ttt | 1056 |  |  |  |
| Ile | Phe | Ile | Thr | Asp | Asp | Ile | His | Leu | Thr | Gly | Glu | Ile | Phe | Ser | Phe |      |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |  |  |  |
| ttc | aga | agt | ttc | ggc | cac | ccc | aga | ctt | gaa | gca | gta | acg | gct | gct | gaa | 1104 |  |  |  |
| Phe | Arg | Ser | Phe | Gly | His | Pro | Arg | Leu | Glu | Ala | Val | Thr | Ala | Ala | Glu |      |  |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |  |  |  |
| aat | gtt | agg | aaa | tac | atg | aat | cag | cct | aaa | gtc | att | gtg | tat | gag | act | 1152 |  |  |  |
| Asn | Val | Arg | Lys | Tyr | Met | Asn | Gln | Pro | Lys | Val | Ile | Val | Tyr | Glu | Thr |      |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ctg | atg | aaa | ggt | cat | gcc | ata | ttt | tgt | gga | atc | ata | atc | aac | ggc | tat | 1200 |  |  |  |
| Leu | Met | Lys | Gly | His | Ala | Ile | Phe | Cys | Gly | Ile | Ile | Ile | Asn | Gly | Tyr |      |  |  |  |
|     | 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |  |  |  |
| cgt | gac | agg | cac | gga | ggc | agt | tgg | cca | ccg | ctg | acc | ctc | ccc | ctg | cat | 1248 |  |  |  |
| Arg | Asp | Arg | His | Gly | Gly | Ser | Trp | Pro | Pro | Leu | Thr | Leu | Pro | Leu | His |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |  |  |  |
| gct | gca | gac | aca | atc | cgg | aat | gct | caa | gct | tca | ggt | gaa | ggg | tta | aca | 1296 |  |  |  |
| Ala | Ala | Asp | Thr | Ile | Arg | Asn | Ala | Gln | Ala | Ser | Gly | Glu | Gly | Leu | Thr |      |  |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |  |  |  |
| cat | gag | cag | tgc | gtt | gat | aac | tgg | aaa | tct | ttt | gct | gga | gtg | aaa | ttt | 1344 |  |  |  |
| His | Glu | Gln | Cys | Val | Asp | Asn | Trp | Lys | Ser | Phe | Ala | Gly | Val | Lys | Phe |      |  |  |  |

ES 2 423 518 T3

| 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| ggc | tgc | ttt | atg | cct | ctt | agc | ctg | gat | agt | gat | ctg | aca | atg | tac | cta | 1392 |
| Gly | Cys | Phe | Met | Pro | Leu | Ser | Leu | Asp | Ser | Asp | Leu | Thr | Met | Tyr | Leu |      |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| aag | gac | aag | gca | ctt | gct | gct | ctc | caa | agg | gaa | tgg | gat | tca | gtt | tac | 1440 |
| Lys | Asp | Lys | Ala | Leu | Ala | Ala | Leu | Gln | Arg | Glu | Trp | Asp | Ser | Val | Tyr |      |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |      |
| ccg | aaa | gag | ttc | ctg | cgt | tac | gac | cct | ccc | aag | gga | acc | ggg | tca | cgg | 1488 |
| Pro | Lys | Glu | Phe | Leu | Arg | Tyr | Asp | Pro | Pro | Lys | Gly | Thr | Gly | Ser | Arg |      |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |      |
| agg | ctt | gta | gat | gtt | ttc | ctt | aat | gat | tcg | agc | ttt | gac | cca | tat | gat | 1536 |
| Arg | Leu | Val | Asp | Val | Phe | Leu | Asn | Asp | Ser | Ser | Phe | Asp | Pro | Tyr | Asp |      |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |      |
| gtg | ata | atg | tat | gtt | gta | agt | gga | gct | tac | ctc | cat | gac | cct | gag | ttc | 1584 |
| Val | Ile | Met | Tyr | Val | Val | Ser | Gly | Ala | Tyr | Leu | His | Asp | Pro | Glu | Phe |      |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |      |
| aac | ctg | tct | tac | agc | ctg | aaa | gaa | aag | gag | atc | aag | gaa | aca | ggt | aga | 1632 |
| Asn | Leu | Ser | Tyr | Ser | Leu | Lys | Glu | Lys | Glu | Ile | Lys | Glu | Thr | Gly | Arg |      |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |
| ctt | ttt | gct | aaa | atg | act | tac | aaa | atg | agg | gca | tgc | caa | gtg | att | gct | 1680 |
| Leu | Phe | Ala | Lys | Met | Thr | Tyr | Lys | Met | Arg | Ala | Cys | Gln | Val | Ile | Ala |      |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |      |
| gaa | aat | cta | atc | tca | aac | ggg | att | ggc | aaa | tat | ttt | aag | gac | aat | ggg | 1728 |
| Glu | Asn | Leu | Ile | Ser | Asn | Gly | Ile | Gly | Lys | Tyr | Phe | Lys | Asp | Asn | Gly |      |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |      |
| atg | gcc | aag | gat | gag | cac | gat | ttg | act | aag | gca | ctc | cac | act | cta | gct | 1776 |
| Met | Ala | Lys | Asp | Glu | His | Asp | Leu | Thr | Lys | Ala | Leu | His | Thr | Leu | Ala |      |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |      |
| gtc | tca | gga | gtc | ccc | aaa | gat | ctc | aaa | gaa | agt | cac | agg | ggg | ggg | cca | 1824 |
| Val | Ser | Gly | Val | Pro | Lys | Asp | Leu | Lys | Glu | Ser | His | Arg | Gly | Gly | Pro |      |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |      |
| gtc | tta | aaa | acc | tac | tcc | cga | agc | cca | gtc | cac | aca | agt | acc | agg | aac | 1872 |
| Val | Leu | Lys | Thr | Tyr | Ser | Arg | Ser | Pro | Val | His | Thr | Ser | Thr | Arg | Asn |      |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |      |
| gtg | aga | gca | gca | aaa | ggg | ttt | ata | ggg | ttc | cct | caa | gta | att | cgg | cag | 1920 |
| Val | Arg | Ala | Ala | Lys | Gly | Phe | Ile | Gly | Phe | Pro | Gln | Val | Ile | Arg | Gln |      |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |      |
| gac | caa | gac | act | gat | cat | ccg | gag | aat | atg | gaa | gct | tac | gag | aca | gtc | 1968 |
| Asp | Gln | Asp | Thr | Asp | His | Pro | Glu | Asn | Met | Glu | Ala | Tyr | Glu | Thr | Val |      |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |      |
| agt | gca | ttt | atc | acg | act | gat | ctc | aag | aag | tac | tgc | ctt | aat | tgg | aga | 2016 |
| Ser | Ala | Phe | Ile | Thr | Thr | Asp | Leu | Lys | Lys | Tyr | Cys | Leu | Asn | Trp | Arg |      |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |      |
| tat | gag | acc | atc | agc | ttg | ttt | gca | cag | agg | cta | aat | gag | att | tac | gga | 2064 |
| Tyr | Glu | Thr | Ile | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Arg | Leu | Asn | Glu | Ile | Tyr | Gly |      |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |      |
| ttg | ccc | tca | ttt | ttc | cag | tgg | ctg | cat | aag | agg | ctt | gag | acc | tct | gtc | 2112 |
| Leu | Pro | Ser | Phe | Phe | Gln | Trp | Leu | His | Lys | Arg | Leu | Glu | Thr | Ser | Val |      |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |      |
| ctg | tat | gta | agt | gac | cct | cat | tgc | ccc | ccc | gac | ctt | gac | gcc | cat | atc | 2160 |
| Leu | Tyr | Val | Ser | Asp | Pro | His | Cys | Pro | Pro | Asp | Leu | Asp | Ala | His | Ile |      |

ES 2 423 518 T3

| 705 |     |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     |     | 715 |     |     |     |      |  | 720 |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|-----|--|
| ccg | tta | tat | aaa | gtc | ccc | aat | gat | caa | atc | ttc | att | aag | tac | cct | atg | 2208 |  |     |  |
| Pro | Leu | Tyr | Lys | Val | Pro | Asn | Asp | Gln | Ile | Phe | Ile | Lys | Tyr | Pro | Met |      |  |     |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |      |  |     |  |
| gga | ggt | ata | gaa | ggg | tat | tgt | cag | aag | ctg | tgg | acc | atc | agc | acc | att | 2256 |  |     |  |
| Gly | Gly | Ile | Glu | Gly | Tyr | Cys | Gln | Lys | Leu | Trp | Thr | Ile | Ser | Thr | Ile |      |  |     |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |      |  |     |  |
| ccc | tat | cta | tac | ctg | gct | gct | tat | gag | agc | gga | gta | agg | att | gct | tcg | 2304 |  |     |  |
| Pro | Tyr | Leu | Tyr | Leu | Ala | Ala | Tyr | Glu | Ser | Gly | Val | Arg | Ile | Ala | Ser |      |  |     |  |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |      |  |     |  |
| tta | gtg | caa | ggg | gac | aat | cag | acc | ata | gcc | gta | aca | aaa | agg | gta | ccc | 2352 |  |     |  |
| Leu | Val | Gln | Gly | Asp | Asn | Gln | Thr | Ile | Ala | Val | Thr | Lys | Arg | Val | Pro |      |  |     |  |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |      |  |     |  |
| agc | aca | tgg | ccc | tac | aac | ctt | aag | aaa | cgg | gaa | gct | gct | aga | gta | act | 2400 |  |     |  |
| Ser | Thr | Trp | Pro | Tyr | Asn | Leu | Lys | Lys | Arg | Glu | Ala | Ala | Arg | Val | Thr |      |  |     |  |
|     |     |     |     | 790 |     |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |      |  |     |  |
| aga | gat | tac | ttt | gta | att | ctt | agg | caa | agg | cta | cat | gat | att | ggc | cat | 2448 |  |     |  |
| Arg | Asp | Tyr | Phe | Val | Ile | Leu | Arg | Gln | Arg | Leu | His | Asp | Ile | Gly | His |      |  |     |  |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |      |  |     |  |
| cac | ctc | aag | gca | aat | gag | aca | att | gtt | tca | tca | cat | ttt | ttt | gtc | tat | 2496 |  |     |  |
| His | Leu | Lys | Ala | Asn | Glu | Thr | Ile | Val | Ser | Ser | His | Phe | Phe | Val | Tyr |      |  |     |  |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |      |  |     |  |
| tca | aaa | gga | ata | tat | tat | gat | ggg | cta | ctt | gtg | tcc | caa | tca | ctc | aag | 2544 |  |     |  |
| Ser | Lys | Gly | Ile | Tyr | Tyr | Asp | Gly | Leu | Leu | Val | Ser | Gln | Ser | Leu | Lys |      |  |     |  |
|     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |      |  |     |  |
| agc | atc | gca | aga | tgt | gta | ttc | tgg | tca | gag | act | ata | gtt | gat | gaa | aca | 2592 |  |     |  |
| Ser | Ile | Ala | Arg | Cys | Val | Phe | Trp | Ser | Glu | Thr | Ile | Val | Asp | Glu | Thr |      |  |     |  |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |      |  |     |  |
| agg | gca | gca | tgc | agt | aat | att | gct | aca | aca | atg | gct | aaa | agc | atc | gag | 2640 |  |     |  |
| Arg | Ala | Ala | Cys | Ser | Asn | Ile | Ala | Thr | Thr | Met | Ala | Lys | Ser | Ile | Glu |      |  |     |  |
|     | 865 |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     |     | 880 |      |  |     |  |
| aga | ggt | tat | gac | cgt | tac | ctt | gca | tat | tcc | ctg | aac | gtc | cta | aaa | gtg | 2688 |  |     |  |
| Arg | Gly | Tyr | Asp | Arg | Tyr | Leu | Ala | Tyr | Ser | Leu | Asn | Val | Leu | Lys | Val |      |  |     |  |
|     |     |     | 885 |     |     |     |     |     | 890 |     |     |     |     | 895 |     |      |  |     |  |
| ata | cag | caa | att | ctg | atc | tct | ctt | ggc | ttc | aca | atc | aat | tca | acc | atg | 2736 |  |     |  |
| Ile | Gln | Gln | Ile | Leu | Ile | Ser | Leu | Gly | Phe | Thr | Ile | Asn | Ser | Thr | Met |      |  |     |  |
|     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     | 910 |     |     |      |  |     |  |
| acc | cgg | gat | gta | gtc | ata | ccc | ctc | ctc | aca | aac | aac | gac | ctc | tta | ata | 2784 |  |     |  |
| Thr | Arg | Asp | Val | Val | Ile | Pro | Leu | Leu | Thr | Asn | Asn | Asp | Leu | Leu | Ile |      |  |     |  |
|     |     | 915 |     |     |     |     | 920 |     |     |     |     | 925 |     |     |     |      |  |     |  |
| agg | atg | gca | ctg | ttg | ccc | gct | cct | att | ggg | ggg | atg | aat | tat | ctg | aat | 2832 |  |     |  |
| Arg | Met | Ala | Leu | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Gly | Gly | Met | Asn | Tyr | Leu | Asn |      |  |     |  |
|     | 930 |     |     |     |     | 935 |     |     |     |     | 940 |     |     |     |     |      |  |     |  |
| atg | agc | agg | ctg | ttt | gtc | aga | aac | atc | ggt | gat | cca | gta | aca | tca | tca | 2880 |  |     |  |
| Met | Ser | Arg | Leu | Phe | Val | Arg | Asn | Ile | Gly | Asp | Pro | Val | Thr | Ser | Ser |      |  |     |  |
|     | 945 |     |     |     | 950 |     |     |     | 955 |     |     |     |     |     | 960 |      |  |     |  |
| att | gct | gat | ctc | aag | aga | atg | att | ctc | gcc | tca | cta | atg | cct | gaa | gag | 2928 |  |     |  |
| Ile | Ala | Asp | Leu | Lys | Arg | Met | Ile | Leu | Ala | Ser | Leu | Met | Pro | Glu | Glu |      |  |     |  |
|     |     |     | 965 |     |     |     |     |     | 970 |     |     |     |     | 975 |     |      |  |     |  |
| acc | ctc | cat | caa | gta | atg | aca | caa | caa | ccg | ggg | gac | tct | tca | ttc | cta | 2976 |  |     |  |
| Thr | Leu | His | Gln | Val | Met | Thr | Gln | Gln | Pro | Gly | Asp | Ser | Ser | Phe | Leu |      |  |     |  |

| 980        |            |            |            | 985        |            |            |            | 990        |            |            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| gac<br>Asp | tgg<br>Trp | gct<br>Ala | agc<br>Ser | gac<br>Asp | cct<br>Pro | tac<br>Tyr | tca<br>Ser | gca<br>Ala | aat<br>Asn | ctt<br>Leu | gta<br>Val | tgt<br>Cys | gtc<br>Val | cag<br>Gln | agc<br>Ser | 3024 |
|            |            | 995        |            |            |            |            | 1000       |            |            |            |            | 1005       |            |            |            |      |
| atc<br>Ile | act<br>Thr | aga<br>Arg | ctc<br>Leu | ctc<br>Leu | aag<br>Lys | aac<br>Asn | ata<br>Ile | act<br>Thr | gca<br>Ala | agg<br>Arg | ttt<br>Phe | gtc<br>Val | ctg<br>Leu | atc<br>Ile |            | 3069 |
|            | 1010       |            |            |            |            | 1015       |            |            |            |            | 1020       |            |            |            |            |      |
| cat<br>His | agt<br>Ser | cca<br>Pro | aac<br>Asn | cca<br>Pro | atg<br>Met | tta<br>Leu | aaa<br>Lys | gga<br>Gly | tta<br>Leu | ttc<br>Phe | cat<br>His | gat<br>Asp | gac<br>Asp | agt<br>Ser |            | 3114 |
|            | 1025       |            |            |            |            | 1030       |            |            |            |            | 1035       |            |            |            |            |      |
| aaa<br>Lys | gaa<br>Glu | gag<br>Glu | gac<br>Asp | gag<br>Glu | gga<br>Gly | ctg<br>Leu | gcg<br>Ala | gca<br>Ala | ttc<br>Phe | ctc<br>Leu | atg<br>Met | gac<br>Asp | agg<br>Arg | cat<br>His |            | 3159 |
|            | 1040       |            |            |            |            | 1045       |            |            |            |            | 1050       |            |            |            |            |      |
| att<br>Ile | ata<br>Ile | gta<br>Val | cct<br>Pro | agg<br>Arg | gca<br>Ala | gct<br>Ala | cat<br>His | gaa<br>Glu | atc<br>Ile | ctg<br>Leu | gat<br>Asp | cat<br>His | agt<br>Ser | gtc<br>Val |            | 3204 |
|            | 1055       |            |            |            |            | 1060       |            |            |            |            | 1065       |            |            |            |            |      |
| aca<br>Thr | ggg<br>Gly | gca<br>Ala | aga<br>Arg | gag<br>Glu | tct<br>Ser | att<br>Ile | gca<br>Ala | ggc<br>Gly | atg<br>Met | ctg<br>Leu | gat<br>Asp | acc<br>Thr | aca<br>Thr | aaa<br>Lys |            | 3249 |
|            | 1070       |            |            |            |            | 1075       |            |            |            |            | 1080       |            |            |            |            |      |
| ggc<br>Gly | ttg<br>Leu | att<br>Ile | cga<br>Arg | gcc<br>Ala | agc<br>Ser | atg<br>Met | agg<br>Arg | aag<br>Lys | ggg<br>Gly | ggg<br>Gly | tta<br>Leu | acc<br>Thr | tct<br>Ser | cga<br>Arg |            | 3294 |
|            | 1085       |            |            |            |            | 1090       |            |            |            |            | 1095       |            |            |            |            |      |
| gtg<br>Val | ata<br>Ile | acc<br>Thr | aga<br>Arg | ttg<br>Leu | tcc<br>Ser | aat<br>Asn | tat<br>Tyr | gac<br>Asp | tat<br>Tyr | gaa<br>Glu | caa<br>Gln | ttc<br>Phe | aga<br>Arg | gca<br>Ala |            | 3339 |
|            | 1100       |            |            |            |            | 1105       |            |            |            |            | 1110       |            |            |            |            |      |
| ggg<br>Gly | atg<br>Met | gtg<br>Val | cta<br>Leu | ttg<br>Leu | aca<br>Thr | gga<br>Gly | aga<br>Arg | aag<br>Lys | aga<br>Arg | aat<br>Asn | gtc<br>Val | ctc<br>Leu | att<br>Ile | gac<br>Asp |            | 3384 |
|            | 1115       |            |            |            |            | 1120       |            |            |            |            | 1125       |            |            |            |            |      |
| aaa<br>Lys | gag<br>Glu | tca<br>Ser | tgt<br>Cys | tca<br>Ser | gtg<br>Val | cag<br>Gln | ctg<br>Leu | gcg<br>Ala | aga<br>Arg | gct<br>Ala | cta<br>Leu | aga<br>Arg | agc<br>Ser | cat<br>His |            | 3429 |
|            | 1130       |            |            |            |            | 1135       |            |            |            |            | 1140       |            |            |            |            |      |
| atg<br>Met | tgg<br>Trp | gcg<br>Ala | agg<br>Arg | cta<br>Leu | gct<br>Ala | cga<br>Arg | gga<br>Gly | cgg<br>Arg | cct<br>Pro | att<br>Ile | tac<br>Tyr | ggc<br>Gly | ctt<br>Leu | gag<br>Glu |            | 3474 |
|            | 1145       |            |            |            |            | 1150       |            |            |            |            | 1155       |            |            |            |            |      |
| gtc<br>Val | cct<br>Pro | gat<br>Asp | gta<br>Val | cta<br>Leu | gaa<br>Glu | tct<br>Ser | atg<br>Met | cga<br>Arg | ggc<br>Gly | cac<br>His | ctt<br>Leu | att<br>Ile | cgg<br>Arg | cgt<br>Arg |            | 3519 |
|            | 1160       |            |            |            |            | 1165       |            |            |            |            | 1170       |            |            |            |            |      |
| cat<br>His | gag<br>Glu | aca<br>Thr | tgt<br>Cys | gtc<br>Val | atc<br>Ile | tgc<br>Cys | gag<br>Glu | tgt<br>Cys | gga<br>Gly | tca<br>Ser | gtc<br>Val | aac<br>Asn | tac<br>Tyr | gga<br>Gly |            | 3564 |
|            | 1175       |            |            |            |            | 1180       |            |            |            |            | 1185       |            |            |            |            |      |
| tgg<br>Trp | ttt<br>Phe | ttt<br>Phe | gtc<br>Val | ccc<br>Pro | tcg<br>Ser | ggt<br>Gly | tgc<br>Cys | caa<br>Gln | ctg<br>Leu | gat<br>Asp | gat<br>Asp | att<br>Ile | gac<br>Asp | aag<br>Lys |            | 3609 |
|            | 1190       |            |            |            |            | 1195       |            |            |            |            | 1200       |            |            |            |            |      |
| gaa<br>Glu | aca<br>Thr | tca<br>Ser | tcc<br>Ser | ttg<br>Leu | aga<br>Arg | gtc<br>Val | cca<br>Pro | tat<br>Tyr | att<br>Ile | ggt<br>Gly | tct<br>Ser | acc<br>Thr | act<br>Thr | gat<br>Asp |            | 3654 |
|            | 1205       |            |            |            |            | 1210       |            |            |            |            | 1215       |            |            |            |            |      |
| gag<br>Glu | aga<br>Arg | aca<br>Thr | gac<br>Asp | atg<br>Met | aag<br>Lys | ctt<br>Leu | gcc<br>Ala | ttc<br>Phe | gta<br>Val | aga<br>Arg | gcc<br>Ala | cca<br>Pro | agt<br>Ser | cga<br>Arg |            | 3699 |
|            | 1220       |            |            |            |            | 1225       |            |            |            |            | 1230       |            |            |            |            |      |
| tcc<br>Ser | ttg<br>Leu | cga<br>Arg | tct<br>Ser | gct<br>Ala | gtt<br>Val | aga<br>Arg | ata<br>Ile | gca<br>Ala | aca<br>Thr | gtg<br>Val | tac<br>Tyr | tca<br>Ser | tgg<br>Trp | gct<br>Ala |            | 3744 |



|            | 1235               |            |            |            |            | 1240               |            |            |            |            | 1245               |            |            |            |  |      |
|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|--|------|
| tac<br>Tyr | ggt<br>Gly<br>1250 | gat<br>Asp | gat<br>Asp | gat<br>Asp | agc<br>Ser | tct<br>Ser<br>1255 | tgg<br>Trp | aac<br>Asn | gaa<br>Glu | gcc<br>Ala | tgg<br>Trp<br>1260 | ttg<br>Leu | ttg<br>Leu | gct<br>Ala |  | 3789 |
| agg<br>Arg | caa<br>Gln<br>1265 | agg<br>Arg | gcc<br>Ala | aat<br>Asn | gtg<br>Val | agc<br>Ser<br>1270 | ctg<br>Leu | gag<br>Glu | gag<br>Glu | cta<br>Leu | agg<br>Arg<br>1275 | gtg<br>Val | atc<br>Ile | act<br>Thr |  | 3834 |
| ccc<br>Pro | atc<br>Ile<br>1280 | tca<br>Ser | act<br>Thr | tcg<br>Ser | act<br>Thr | aat<br>Asn<br>1285 | tta<br>Leu | gcg<br>Ala | cat<br>His | agg<br>Arg | ttg<br>Leu<br>1290 | agg<br>Arg | gat<br>Asp | cgt<br>Arg |  | 3879 |
| agc<br>Ser | act<br>Thr<br>1295 | caa<br>Gln | gtg<br>Val | aaa<br>Lys | tac<br>Tyr | tca<br>Ser<br>1300 | ggt<br>Gly | aca<br>Thr | tcc<br>Ser | ctt<br>Leu | gtc<br>Val<br>1305 | cga<br>Arg | gtg<br>Val | gcg<br>Ala |  | 3924 |
| agg<br>Arg | tat<br>Tyr<br>1310 | acc<br>Thr | aca<br>Thr | atc<br>Ile | tcc<br>Ser | aac<br>Asn<br>1315 | gac<br>Asp | aat<br>Asn | ctc<br>Leu | tca<br>Ser | ttt<br>Phe<br>1320 | gtc<br>Val | ata<br>Ile | tca<br>Ser |  | 3969 |
| gat<br>Asp | aag<br>Lys<br>1325 | aag<br>Lys | ggt<br>Val | gat<br>Asp | act<br>Thr | aac<br>Asn<br>1330 | ttt<br>Phe | ata<br>Ile | tac<br>Tyr | caa<br>Gln | caa<br>Gln<br>1335 | gga<br>Gly | atg<br>Met | ctt<br>Leu |  | 4014 |
| cta<br>Leu | ggg<br>Gly<br>1340 | ttg<br>Leu | ggt<br>Gly | gtt<br>Val | tta<br>Leu | gaa<br>Glu<br>1345 | aca<br>Thr | ttg<br>Leu | ttt<br>Phe | cga<br>Arg | ctc<br>Leu<br>1350 | gag<br>Glu | aaa<br>Lys | gat<br>Asp |  | 4059 |
| acc<br>Thr | gga<br>Gly<br>1355 | tca<br>Ser | tct<br>Ser | aac<br>Asn | acg<br>Thr | gta<br>Val<br>1360 | tta<br>Leu | cat<br>His | ctt<br>Leu | cac<br>His | gtc<br>Val<br>1365 | gaa<br>Glu | aca<br>Thr | gat<br>Asp |  | 4104 |
| tgt<br>Cys | tgc<br>Cys<br>1370 | gtg<br>Val | atc<br>Ile | ccg<br>Pro | atg<br>Met | ata<br>Ile<br>1375 | gat<br>Asp | cat<br>His | ccc<br>Pro | agg<br>Arg | ata<br>Ile<br>1380 | ccc<br>Pro | agc<br>Ser | tcc<br>Ser |  | 4149 |
| cgc<br>Arg | aag<br>Lys<br>1385 | cta<br>Leu | gag<br>Glu | ctg<br>Leu | agg<br>Arg | gca<br>Ala<br>1390 | gag<br>Glu | cta<br>Leu | tgt<br>Cys | acc<br>Thr | aac<br>Asn<br>1395 | cca<br>Pro | ttg<br>Leu | ata<br>Ile |  | 4194 |
| tat<br>Tyr | gat<br>Asp<br>1400 | aat<br>Asn | gca<br>Ala | cct<br>Pro | tta<br>Leu | att<br>Ile<br>1405 | gac<br>Asp | aga<br>Arg | gat<br>Asp | gca<br>Ala | aca<br>Thr<br>1410 | agg<br>Arg | cta<br>Leu | tac<br>Tyr |  | 4239 |
| acc<br>Thr | cag<br>Gln<br>1415 | agc<br>Ser | cat<br>His | agg<br>Arg | agg<br>Arg | cac<br>His<br>1420 | ctt<br>Leu | gtg<br>Val | gaa<br>Glu | ttt<br>Phe | gtt<br>Val<br>1425 | aca<br>Thr | tgg<br>Trp | tcc<br>Ser |  | 4284 |
| aca<br>Thr | ccc<br>Pro<br>1430 | caa<br>Gln | cta<br>Leu | tat<br>Tyr | cac<br>His | att<br>Ile<br>1435 | tta<br>Leu | gct<br>Ala | aag<br>Lys | tcc<br>Ser | aca<br>Thr<br>1440 | gca<br>Ala | cta<br>Leu | tct<br>Ser |  | 4329 |
| atg<br>Met | att<br>Ile<br>1445 | gac<br>Asp | ctg<br>Leu | gta<br>Val | aca<br>Thr | aaa<br>Lys<br>1450 | ttt<br>Phe | gag<br>Glu | aag<br>Lys | gac<br>Asp | cat<br>His<br>1455 | atg<br>Met | aat<br>Asn | gaa<br>Glu |  | 4374 |
| att<br>Ile | tca<br>Ser<br>1460 | gct<br>Ala | ctc<br>Leu | ata<br>Ile | ggg<br>Gly | gat<br>Asp<br>1465 | gac<br>Asp | gat<br>Asp | atc<br>Ile | aat<br>Asn | agt<br>Ser<br>1470 | ttc<br>Phe | ata<br>Ile | act<br>Thr |  | 4419 |
| gag<br>Glu | ttt<br>Phe<br>1475 | ctg<br>Leu | ctc<br>Leu | ata<br>Ile | gag<br>Glu | cca<br>Pro<br>1480 | aga<br>Arg | tta<br>Leu | ttc<br>Phe | act<br>Thr | atc<br>Ile<br>1485 | tac<br>Tyr | ttg<br>Leu | ggc<br>Gly |  | 4464 |
| cag<br>Gln | tgt<br>Cys         | gcg<br>Ala | gcc<br>Ala | atc<br>Ile | aat<br>Asn | tgg<br>Trp         | gca<br>Ala | ttt<br>Phe | gat<br>Asp | gta<br>Val | cat<br>His         | tat<br>Tyr | cat<br>His | aga<br>Arg |  | 4509 |

| 1490       |                    |            | 1495       |            |            |                    |            | 1500       |            |            |                    |            |            |            |      |
|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------|
| cca<br>Pro | tca<br>Ser<br>1505 | ggg<br>Gly | aaa<br>Lys | tat<br>Tyr | cag<br>Gln | atg<br>Met<br>1510 | ggt<br>Gly | gag<br>Glu | ctg<br>Leu | ttg<br>Leu | tca<br>Ser<br>1515 | tcg<br>Ser | ttc<br>Phe | ctt<br>Leu | 4554 |
| tct<br>Ser | aga<br>Arg<br>1520 | atg<br>Met | agc<br>Ser | aaa<br>Lys | gga<br>Gly | gtg<br>Val<br>1525 | ttt<br>Phe | aag<br>Lys | gtg<br>Val | ctt<br>Leu | gtc<br>Val<br>1530 | aat<br>Asn | gct<br>Ala | cta<br>Leu | 4599 |
| agc<br>Ser | cac<br>His<br>1535 | cca<br>Pro | aag<br>Lys | atc<br>Ile | tac<br>Tyr | aag<br>Lys<br>1540 | aaa<br>Lys | ttc<br>Phe | tgg<br>Trp | cat<br>His | tgt<br>Cys<br>1545 | ggt<br>Gly | att<br>Ile | ata<br>Ile | 4644 |
| gag<br>Glu | cct<br>Pro<br>1550 | atc<br>Ile | cat<br>His | ggt<br>Gly | cct<br>Pro | tca<br>Ser<br>1555 | ctt<br>Leu | gat<br>Asp | gct<br>Ala | caa<br>Gln | aac<br>Asn<br>1560 | ttg<br>Leu | cac<br>His | aca<br>Thr | 4689 |
| act<br>Thr | gtg<br>Val<br>1565 | tgc<br>Cys | aac<br>Asn | atg<br>Met | gtt<br>Val | tac<br>Tyr<br>1570 | aca<br>Thr | tgc<br>Cys | tat<br>Tyr | atg<br>Met | acc<br>Thr<br>1575 | tac<br>Tyr | ctc<br>Leu | gac<br>Asp | 4734 |
| ctg<br>Leu | ttg<br>Leu<br>1580 | ttg<br>Leu | aat<br>Asn | gaa<br>Glu | gag<br>Glu | tta<br>Leu<br>1585 | gaa<br>Glu | gag<br>Glu | ttc<br>Phe | aca<br>Thr | ttt<br>Phe<br>1590 | ctc<br>Leu | ttg<br>Leu | tgt<br>Cys | 4779 |
| gaa<br>Glu | agc<br>Ser<br>1595 | gac<br>Asp | gag<br>Glu | gat<br>Asp | gta<br>Val | gta<br>Val<br>1600 | ccg<br>Pro | gac<br>Asp | aga<br>Arg | ttc<br>Phe | gac<br>Asp<br>1605 | aac<br>Asn | atc<br>Ile | cag<br>Gln | 4824 |
| gca<br>Ala | aaa<br>Lys<br>1610 | cac<br>His | tta<br>Leu | tgt<br>Cys | gtt<br>Val | ctg<br>Leu<br>1615 | gca<br>Ala | gat<br>Asp | ttg<br>Leu | tac<br>Tyr | tgt<br>Cys<br>1620 | caa<br>Gln | cca<br>Pro | ggg<br>Gly | 4869 |
| acc<br>Thr | tgc<br>Cys<br>1625 | cca<br>Pro | cca<br>Pro | att<br>Ile | cga<br>Arg | ggt<br>Gly<br>1630 | cta<br>Leu | aga<br>Arg | ccg<br>Pro | gta<br>Val | gag<br>Glu<br>1635 | aaa<br>Lys | tgt<br>Cys | gca<br>Ala | 4914 |
| ggt<br>Val | cta<br>Leu<br>1640 | acc<br>Thr | gac<br>Asp | cat<br>His | atc<br>Ile | aag<br>Lys<br>1645 | gca<br>Ala | gag<br>Glu | gct<br>Ala | atg<br>Met | tta<br>Leu<br>1650 | tct<br>Ser | cca<br>Pro | gca<br>Ala | 4959 |
| gga<br>Gly | tct<br>Ser<br>1655 | tcg<br>Ser | tgg<br>Trp | aac<br>Asn | ata<br>Ile | aat<br>Asn<br>1660 | cca<br>Pro | att<br>Ile | att<br>Ile | gta<br>Val | gac<br>Asp<br>1665 | cat<br>His | tac<br>Tyr | tca<br>Ser | 5004 |
| tgc<br>Cys | tct<br>Ser<br>1670 | ctg<br>Leu | act<br>Thr | tat<br>Tyr | ctc<br>Leu | cgg<br>Arg<br>1675 | cga<br>Arg | gga<br>Gly | tcg<br>Ser | atc<br>Ile | aaa<br>Lys<br>1680 | cag<br>Gln | ata<br>Ile | aga<br>Arg | 5049 |
| ttg<br>Leu | aga<br>Arg<br>1685 | gtt<br>Val | gat<br>Asp | cca<br>Pro | gga<br>Gly | ttc<br>Phe<br>1690 | att<br>Ile | ttc<br>Phe | gac<br>Asp | gcc<br>Ala | ctc<br>Leu<br>1695 | gct<br>Ala | gag<br>Glu | gta<br>Val | 5094 |
| aat<br>Asn | gtc<br>Val<br>1700 | agt<br>Ser | cag<br>Gln | cca<br>Pro | aag<br>Lys | atc<br>Ile<br>1705 | ggc<br>Gly | agc<br>Ser | aac<br>Asn | aac<br>Asn | atc<br>Ile<br>1710 | tca<br>Ser | aat<br>Asn | atg<br>Met | 5139 |
| agc<br>Ser | atc<br>Ile<br>1715 | aag<br>Lys | gct<br>Ala | ttc<br>Phe | aga<br>Arg | ccc<br>Pro<br>1720 | cca<br>Pro | cac<br>His | gat<br>Asp | gat<br>Asp | gtt<br>Val<br>1725 | gca<br>Ala | aaa<br>Lys | ttg<br>Leu | 5184 |
| ctc<br>Leu | aaa<br>Lys<br>1730 | gat<br>Asp | atc<br>Ile | aac<br>Asn | aca<br>Thr | agc<br>Ser<br>1735 | aag<br>Lys | cac<br>His | aat<br>Asn | ctt<br>Leu | ccc<br>Pro<br>1740 | att<br>Ile | tca<br>Ser | ggg<br>Gly | 5229 |
| ggc<br>Gly | aat<br>Asn         | ctc<br>Leu | gcc<br>Ala | aat<br>Asn | tat<br>Tyr | gaa<br>Glu         | atc<br>Ile | cat<br>His | gct<br>Ala | ttc<br>Phe | cgc<br>Arg         | aga<br>Arg | atc<br>Ile | ggg<br>Gly | 5274 |

| 1745       |                    |            | 1750       |            |            |                    |            | 1755       |            |            |                    |            |            |            |      |
|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------|
| ttg<br>Leu | aac<br>Asn<br>1760 | tca<br>Ser | tct<br>Ser | gct<br>Ala | tgc<br>Cys | tac<br>Tyr<br>1765 | aaa<br>Lys | gct<br>Ala | ggt<br>Val | gag<br>Glu | ata<br>Ile<br>1770 | tca<br>Ser | aca<br>Thr | tta<br>Leu | 5319 |
| att<br>Ile | agg<br>Arg<br>1775 | aga<br>Arg | tgc<br>Cys | ctt<br>Leu | gag<br>Glu | cca<br>Pro<br>1780 | ggg<br>Gly | gag<br>Glu | gac<br>Asp | ggc<br>Gly | ttg<br>Leu<br>1785 | ttc<br>Phe | ttg<br>Leu | ggt<br>Gly | 5364 |
| gag<br>Glu | gga<br>Gly<br>1790 | tcg<br>Ser | ggt<br>Gly | tct<br>Ser | atg<br>Met | ttg<br>Leu<br>1795 | atc<br>Ile | act<br>Thr | tat<br>Tyr | aaa<br>Lys | gag<br>Glu<br>1800 | ata<br>Ile | ctt<br>Leu | aaa<br>Lys | 5409 |
| cta<br>Leu | aac<br>Asn<br>1805 | aag<br>Lys | tgc<br>Cys | ttc<br>Phe | tat<br>Tyr | aat<br>Asn<br>1810 | agt<br>Ser | ggg<br>Gly | ggt<br>Val | tcc<br>Ser | gcc<br>Ala<br>1815 | aat<br>Asn | tct<br>Ser | aga<br>Arg | 5454 |
| tct<br>Ser | ggt<br>Gly<br>1820 | caa<br>Gln | agg<br>Arg | gaa<br>Glu | tta<br>Leu | gca<br>Ala<br>1825 | ccc<br>Pro | tat<br>Tyr | ccc<br>Pro | tcc<br>Ser | gaa<br>Glu<br>1830 | ggt<br>Val | ggc<br>Gly | ctt<br>Leu | 5499 |
| gtc<br>Val | gaa<br>Glu<br>1835 | cac<br>His | aga<br>Arg | atg<br>Met | gga<br>Gly | gta<br>Val<br>1840 | ggt<br>Gly | aat<br>Asn | att<br>Ile | gtc<br>Val | aaa<br>Lys<br>1845 | gtg<br>Val | ctc<br>Leu | ttt<br>Phe | 5544 |
| aac<br>Asn | ggg<br>Gly<br>1850 | agg<br>Arg | ccc<br>Pro | gaa<br>Glu | gtc<br>Val | acg<br>Thr<br>1855 | tgg<br>Trp | gta<br>Val | ggc<br>Gly | agt<br>Ser | gta<br>Val<br>1860 | gat<br>Asp | tgc<br>Cys | ttc<br>Phe | 5589 |
| aat<br>Asn | ttc<br>Phe<br>1865 | ata<br>Ile | gtt<br>Val | agt<br>Ser | aat<br>Asn | atc<br>Ile<br>1870 | cct<br>Pro | acc<br>Thr | tct<br>Ser | agt<br>Ser | gtg<br>Val<br>1875 | ggg<br>Gly | ttt<br>Phe | atc<br>Ile | 5634 |
| cat<br>His | tca<br>Ser<br>1880 | gat<br>Asp | ata<br>Ile | gag<br>Glu | acc<br>Thr | ttg<br>Leu<br>1885 | cct<br>Pro | gac<br>Asp | aaa<br>Lys | gat<br>Asp | act<br>Thr<br>1890 | ata<br>Ile | gag<br>Glu | aag<br>Lys | 5679 |
| cta<br>Leu | gag<br>Glu<br>1895 | gaa<br>Glu | ttg<br>Leu | gca<br>Ala | gcc<br>Ala | atc<br>Ile<br>1900 | tta<br>Leu | tcg<br>Ser | atg<br>Met | gct<br>Ala | ctg<br>Leu<br>1905 | ctc<br>Leu | ctg<br>Leu | ggc<br>Gly | 5724 |
| aaa<br>Lys | ata<br>Ile<br>1910 | gga<br>Gly | tca<br>Ser | ata<br>Ile | ctg<br>Leu | gtg<br>Val<br>1915 | att<br>Ile | aag<br>Lys | ctt<br>Leu | atg<br>Met | cct<br>Pro<br>1920 | ttc<br>Phe | agc<br>Ser | ggg<br>Gly | 5769 |
| gat<br>Asp | ttt<br>Phe<br>1925 | gtt<br>Val | cag<br>Gln | gga<br>Gly | ttt<br>Phe | ata<br>Ile<br>1930 | agt<br>Ser | tat<br>Tyr | gta<br>Val | ggg<br>Gly | tct<br>Ser<br>1935 | cat<br>His | tat<br>Tyr | aga<br>Arg | 5814 |
| gaa<br>Glu | gtg<br>Val<br>1940 | aac<br>Asn | ctt<br>Leu | gta<br>Val | tac<br>Tyr | cct<br>Pro<br>1945 | aga<br>Arg | tac<br>Tyr | agc<br>Ser | aac<br>Asn | ttc<br>Phe<br>1950 | atc<br>Ile | tct<br>Ser | act<br>Thr | 5859 |
| gaa<br>Glu | tct<br>Ser<br>1955 | tat<br>Tyr | ttg<br>Leu | ggt<br>Val | atg<br>Met | aca<br>Thr<br>1960 | gat<br>Asp | ctc<br>Leu | aag<br>Lys | gct<br>Ala | aac<br>Asn<br>1965 | cgg<br>Arg | cta<br>Leu | atg<br>Met | 5904 |
| aat<br>Asn | cct<br>Pro<br>1970 | gaa<br>Glu | aag<br>Lys | att<br>Ile | aag<br>Lys | cag<br>Gln<br>1975 | cag<br>Gln | ata<br>Ile | att<br>Ile | gaa<br>Glu | tca<br>Ser<br>1980 | tct<br>Ser | gtg<br>Val | agg<br>Arg | 5949 |
| act<br>Thr | tca<br>Ser<br>1985 | cct<br>Pro | gga<br>Gly | ctt<br>Leu | ata<br>Ile | ggt<br>Gly<br>1990 | cac<br>His | atc<br>Ile | cta<br>Leu | tcc<br>Ser | att<br>Ile<br>1995 | aag<br>Lys | caa<br>Gln | cta<br>Leu | 5994 |
| agc<br>Ser | tgc<br>Cys         | ata<br>Ile | caa<br>Gln | gca<br>Ala | att<br>Ile | gtg<br>Val         | gga<br>Gly | gac<br>Asp | gca<br>Ala | ggt<br>Val | agt<br>Ser         | aga<br>Arg | ggt<br>Gly | gat<br>Asp | 6039 |

ES 2 423 518 T3

|  | 2000       |                    |            |            |            | 2005       |                    |            |            |            |            |                    |            |            | 2010       |      |
|--|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|------|
|  | atc<br>Ile | aat<br>Asn<br>2015 | cct<br>Pro | act<br>Thr | ctg<br>Leu | aaa<br>Lys | aaa<br>Lys<br>2020 | ctt<br>Leu | aca<br>Thr | cct<br>Pro | ata<br>Ile | gag<br>Glu<br>2025 | cag<br>Gln | gtg<br>Val | ctg<br>Leu | 6084 |
|  | atc<br>Ile | aat<br>Asn<br>2030 | tgc<br>Cys | ggg<br>Gly | ttg<br>Leu | gca<br>Ala | att<br>Ile<br>2035 | aac<br>Asn | gga<br>Gly | cct<br>Pro | aag<br>Lys | ctg<br>Leu<br>2040 | tgc<br>Cys | aaa<br>Lys | gaa<br>Glu | 6129 |
|  | ttg<br>Leu | atc<br>Ile<br>2045 | cac<br>His | cat<br>His | gat<br>Asp | ggt<br>Val | gcc<br>Ala<br>2050 | tca<br>Ser | ggg<br>Gly | caa<br>Gln | gat<br>Asp | gga<br>Gly<br>2055 | ttg<br>Leu | ctt<br>Leu | aat<br>Asn | 6174 |
|  | tct<br>Ser | ata<br>Ile<br>2060 | ctc<br>Leu | atc<br>Ile | ctc<br>Leu | tac<br>Tyr | agg<br>Arg<br>2065 | gag<br>Glu | ttg<br>Leu | gca<br>Ala | aga<br>Arg | ttc<br>Phe<br>2070 | aaa<br>Lys | gac<br>Asp | aac<br>Asn | 6219 |
|  | caa<br>Gln | aga<br>Arg<br>2075 | agt<br>Ser | caa<br>Gln | caa<br>Gln | ggg<br>Gly | atg<br>Met<br>2080 | ttc<br>Phe | cac<br>His | gct<br>Ala | tac<br>Tyr | ccc<br>Pro<br>2085 | gta<br>Val | ttg<br>Leu | gta<br>Val | 6264 |
|  | agt<br>Ser | agc<br>Ser<br>2090 | agg<br>Arg | caa<br>Gln | cga<br>Arg | gaa<br>Glu | ctt<br>Leu<br>2095 | ata<br>Ile | tct<br>Ser | agg<br>Arg | atc<br>Ile | acc<br>Thr<br>2100 | cgc<br>Arg | aaa<br>Lys | ttc<br>Phe | 6309 |
|  | tgg<br>Trp | ggg<br>Gly<br>2105 | cac<br>His | att<br>Ile | ctt<br>Leu | ctt<br>Leu | tac<br>Tyr<br>2110 | tcc<br>Ser | ggg<br>Gly | aac<br>Asn | aaa<br>Lys | aag<br>Lys<br>2115 | ttg<br>Leu | ata<br>Ile | aat<br>Asn | 6354 |
|  | aag<br>Lys | ttt<br>Phe<br>2120 | atc<br>Ile | cag<br>Gln | aat<br>Asn | ctc<br>Leu | aag<br>Lys<br>2125 | tcc<br>Ser | ggc<br>Gly | tat<br>Tyr | ctg<br>Leu | ata<br>Ile<br>2130 | cta<br>Leu | gac<br>Asp | tta<br>Leu | 6399 |
|  | cac<br>His | cag<br>Gln<br>2135 | aat<br>Asn | atc<br>Ile | ttc<br>Phe | ggt<br>Val | aag<br>Lys<br>2140 | aat<br>Asn | cta<br>Leu | tcc<br>Ser | aag<br>Lys | tca<br>Ser<br>2145 | gag<br>Glu | aaa<br>Lys | cag<br>Gln | 6444 |
|  | att<br>Ile | att<br>Ile<br>2150 | atg<br>Met | acg<br>Thr | ggg<br>Gly | ggt<br>Gly | ttg<br>Leu<br>2155 | aaa<br>Lys | cgt<br>Arg | gag<br>Glu | tgg<br>Trp | ggt<br>Val<br>2160 | ttt<br>Phe | aag<br>Lys | gta<br>Val | 6489 |
|  | aca<br>Thr | gtc<br>Val<br>2165 | aag<br>Lys | gag<br>Glu | acc<br>Thr | aaa<br>Lys | gaa<br>Glu<br>2170 | tgg<br>Trp | tat<br>Tyr | aag<br>Lys | tta<br>Leu | gtc<br>Val<br>2175 | gga<br>Gly | tac<br>Tyr | agt<br>Ser | 6534 |
|  | gcc<br>Ala | ctg<br>Leu<br>2180 | att<br>Ile | aag<br>Lys | gac<br>Asp | taa        |                    |            |            |            |            |                    |            |            |            | 6552 |

<210> 17  
 <211> 2183  
 <212> PRT  
 <213> Virus de sarampión  
 <400> 17

Met Asp Ser Leu Ser Val Asn Gln Ile Leu Tyr Pro Glu Val His Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Ser Pro Ile Val Thr Asn Lys Ile Val Ala Ile Leu Glu Tyr Ala  
 20 25 30  
 Arg Val Pro His Ala Tyr Ser Leu Glu Asp Pro Thr Leu Cys Gln Asn  
 35 40 45

5

10

ES 2 423 518 T3

Ile Lys His Arg Leu Lys Asn Gly Phe Ser Asn Gln Met Ile Ile Asn  
50 55 60

Asn Val Glu Val Gly Asn Val Ile Lys Ser Lys Leu Arg Ser Tyr Pro  
65 70 75 80

Ala His Ser His Ile Pro Tyr Pro Asn Cys Asn Gln Asp Leu Phe Asn  
85 90 95

Ile Glu Asp Lys Glu Ser Thr Arg Lys Ile Arg Glu Leu Leu Lys Lys  
100 105 110

Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Lys Val Ser Asp Lys Val Phe Gln Cys Leu  
115 120 125

Arg Asp Thr Asn Ser Arg Leu Gly Leu Gly Ser Glu Leu Arg Glu Asp  
130 135 140

Ile Lys Glu Lys Val Ile Asn Leu Gly Val Tyr Met His Ser Ser Gln  
145 150 155 160

Trp Phe Glu Pro Phe Leu Phe Trp Phe Thr Val Lys Thr Glu Met Arg  
165 170 175

Ser Val Ile Lys Ser Gln Thr His Thr Cys His Arg Arg Arg His Thr  
180 185 190

Pro Val Phe Phe Thr Gly Ser Ser Val Glu Leu Leu Ile Ser Arg Asp  
195 200 205

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

Phe Glu Leu Val Leu Met Tyr Cys Asp Val Ile Glu Gly Arg Leu Met  
225 230 235 240

Thr Glu Thr Ala Met Thr Ile Asp Ala Arg Tyr Thr Glu Leu Leu Gly  
245 250 255

Arg Val Arg Tyr Met Trp Lys Leu Ile Asp Gly Phe Phe Pro Ala Leu  
260 265 270

Gly Asn Pro Thr Tyr Gln Ile Val Ala Met Leu Glu Pro Leu Ser Leu  
275 280 285

Ala Tyr Leu Gln Leu Arg Asp Ile Thr Val Glu Leu Arg Gly Ala Phe  
290 295 300

Leu Asn His Cys Phe Thr Glu Ile His Asp Val Leu Asp Gln Asn Gly  
305 310 315 320

Phe Ser Asp Glu Gly Thr Tyr His Glu Leu Thr Glu Ala Leu Asp Tyr  
 325 330 335  
 Ile Phe Ile Thr Asp Asp Ile His Leu Thr Gly Glu Ile Phe Ser Phe  
 340 345 350  
 Phe Arg Ser Phe Gly His Pro Arg Leu Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu  
 355 360 365  
 Asn Val Arg Lys Tyr Met Asn Gln Pro Lys Val Ile Val Tyr Glu Thr  
 370 375 380  
 Leu Met Lys Gly His Ala Ile Phe Cys Gly Ile Ile Ile Asn Gly Tyr  
 385 390 395 400  
 Arg Asp Arg His Gly Gly Ser Trp Pro Pro Leu Thr Leu Pro Leu His  
 405 410 415  
 Ala Ala Asp Thr Ile Arg Asn Ala Gln Ala Ser Gly Glu Gly Leu Thr  
 420 425  
 His Glu Gln Cys Val Asp Asn Trp Lys Ser Phe Ala Gly Val Lys Phe  
 435 440 445  
 Gly Cys Phe Met Pro Leu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Thr Met Tyr Leu  
 450 455 460  
 Lys Asp Lys Ala Leu Ala Ala Leu Gln Arg Glu Trp Asp Ser Val Tyr  
 465 470 475 480  
 Pro Lys Glu Phe Leu Arg Tyr Asp Pro Pro Lys Gly Thr Gly Ser Arg  
 485 490 495  
 Arg Leu Val Asp Val Phe Leu Asn Asp Ser Ser Phe Asp Pro Tyr Asp  
 500 505 510  
 Val Ile Met Tyr Val Val Ser Gly Ala Tyr Leu His Asp Pro Glu Phe  
 515 520 525  
 Asn Leu Ser Tyr Ser Leu Lys Glu Lys Glu Ile Lys Glu Thr Gly Arg  
 530 535 540  
 Leu Phe Ala Lys Met Thr Tyr Lys Met Arg Ala Cys Gln Val Ile Ala  
 545 550 555 560  
 Glu Asn Leu Ile Ser Asn Gly Ile Gly Lys Tyr Phe Lys Asp Asn Gly  
 565 570 575  
 Met Ala Lys Asp Glu His Asp Leu Thr Lys Ala Leu His Thr Leu Ala  
 580 585 590

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

Arg Ala Ala Cys Ser Asn Ile Ala Thr Thr Met Ala Lys Ser Ile Glu  
 865 870 875 880  
 Arg Gly Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Tyr Ser Leu Asn Val Leu Lys Val  
 885 890 895  
 Ile Gln Gln Ile Leu Ile Ser Leu Gly Phe Thr Ile Asn Ser Thr Met  
 900 905 910  
 Thr Arg Asp Val Val Ile Pro Leu Leu Thr Asn Asn Asp Leu Leu Ile  
 915 920 925  
 Arg Met Ala Leu Leu Pro Ala Pro Ile Gly Gly Met Asn Tyr Leu Asn  
 930 935 940  
 Met Ser Arg Leu Phe Val Arg Asn Ile Gly Asp Pro Val Thr Ser Ser  
 945 950 955 960  
 Ile Ala Asp Leu Lys Arg Met Ile Leu Ala Ser Leu Met Pro Glu Glu  
 965 970 975  
 Thr Leu His Gln Val Met Thr Gln Gln Pro Gly Asp Ser Ser Phe Leu  
 980 985 990  
 Asp Trp Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Val Cys Val Gln Ser  
 995 1000 1005  
 Ile Thr Arg Leu Leu Lys Asn Ile Thr Ala Arg Phe Val Leu Ile  
 1010 1015 1020  
 His Ser Pro Asn Pro Met Leu Lys Gly Leu Phe His Asp Asp Ser  
 1025 1030 1035  
 Lys Glu Glu Asp Glu Gly Leu Ala Ala Phe Leu Met Asp Arg His  
 1040 1045 1050  
 Ile Ile Val Pro Arg Ala Ala His Glu Ile Leu Asp His Ser Val  
 1055 1060 1065  
 Thr Gly Ala Arg Glu Ser Ile Ala Gly Met Leu Asp Thr Thr Lys  
 1070 1075 1080  
 Gly Leu Ile Arg Ala Ser Met Arg Lys Gly Gly Leu Thr Ser Arg  
 1085 1090 1095  
 Val Ile Thr Arg Leu Ser Asn Tyr Asp Tyr Glu Gln Phe Arg Ala  
 1100 1105 1110  
 Gly Met Val Leu Leu Thr Gly Arg Lys Arg Asn Val Leu Ile Asp  
 1115 1120 1125



Lys Glu Ser Cys Ser Val Gln Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ser His  
 1130 1135 1140  
 Met Trp Ala Arg Leu Ala Arg Gly Arg Pro Ile Tyr Gly Leu Glu  
 1145 1150 1155  
 Val Pro Asp Val Leu Glu Ser Met Arg Gly His Leu Ile Arg Arg  
 1160 1165 1170  
 His Glu Thr Cys Val Ile Cys Glu Cys Gly Ser Val Asn Tyr Gly  
 1175 1180 1185  
 Trp Phe Phe Val Pro Ser Gly Cys Gln Leu Asp Asp Ile Asp Lys  
 1190 1200  
 Glu Thr Ser Ser Leu Arg Val Pro Tyr Ile Gly Ser Thr Thr Asp  
 1205 1210 1215  
 Glu Arg Thr Asp Met Lys Leu Ala Phe Val Arg Ala Pro Ser Arg  
 1220 1225 1230  
 Ser Leu Arg Ser Ala Val Arg Ile Ala Thr Val Tyr Ser Trp Ala  
 1235 1240 1245  
 Tyr Gly Asp Asp Asp Ser Ser Trp Asn Glu Ala Trp Leu Leu Ala  
 1250 1255 1260  
 Arg Gln Arg Ala Asn Val Ser Leu Glu Glu Leu Arg Val Ile Thr  
 1265 1270 1275  
 Pro Ile Ser Thr Ser Thr Asn Leu Ala His Arg Leu Arg Asp Arg  
 1280 1285 1290  
 Ser Thr Gln Val Lys Tyr Ser Gly Thr Ser Leu Val Arg Val Ala  
 1295 1300 1305  
 Arg Tyr Thr Thr Ile Ser Asn Asp Asn Leu Ser Phe Val Ile Ser  
 1310 1315 1320  
 Asp Lys Lys Val Asp Thr Asn Phe Ile Tyr Gln Gln Gly Met Leu  
 1325 1330 1335  
 Leu Gly Leu Gly Val Leu Glu Thr Leu Phe Arg Leu Glu Lys Asp  
 1340 1345 1350  
 Thr Gly Ser Ser Asn Thr Val Leu His Leu His Val Glu Thr Asp  
 1355 1360 1365  
 Cys Cys Val Ile Pro Met Ile Asp His Pro Arg Ile Pro Ser Ser  
 1370 1375 1380

Arg Lys Leu Glu Leu Arg Ala Glu Leu Cys Thr Asn Pro Leu Ile  
 1385 1390 1395  
 Tyr Asp Asn Ala Pro Leu Ile Asp Arg Asp Ala Thr Arg Leu Tyr  
 1400 1405 1410  
 Thr Gln Ser His Arg Arg His Leu Val Glu Phe Val Thr Trp Ser  
 1415 1420 1425  
 Thr Pro Gln Leu Tyr His Ile Leu Ala Lys Ser Thr Ala Leu Ser  
 1430 1435 1440  
 Met Ile Asp Leu Val Thr Lys Phe Glu Lys Asp His Met Asn Glu  
 1445 1450 1455  
 Ile Ser Ala Leu Ile Gly Asp Asp Asp Ile Asn Ser Phe Ile Thr  
 1460 1465 1470  
 Glu Phe Leu Leu Ile Glu Pro Arg Leu Phe Thr Ile Tyr Leu Gly  
 1475 1480 1485  
 Gln Cys Ala Ala Ile Asn Trp Ala Phe Asp Val His Tyr His Arg  
 1490 1495 1500  
 Pro Ser Gly Lys Tyr Gln Met Gly Glu Leu Leu Ser Ser Phe Leu  
 1505 1510 1515  
 Ser Arg Met Ser Lys Gly Val Phe Lys Val Leu Val Asn Ala Leu  
 1520 1525 1530  
 Ser His Pro Lys Ile Tyr Lys Lys Phe Trp His Cys Gly Ile Ile  
 1535 1540 1545  
 Glu Pro Ile His Gly Pro Ser Leu Asp Ala Gln Asn Leu His Thr  
 1550 1555 1560  
 Thr Val Cys Asn Met Val Tyr Thr Cys Tyr Met Thr Tyr Leu Asp  
 1565 1570 1575  
 Leu Leu Leu Asn Glu Glu Leu Glu Glu Phe Thr Phe Leu Leu Cys  
 1580 1585 1590  
 Glu Ser Asp Glu Asp Val Val Pro Asp Arg Phe Asp Asn Ile Gln  
 1595 1600 1605  
 Ala Lys His Leu Cys Val Leu Ala Asp Leu Tyr Cys Gln Pro Gly  
 1610 1615 1620  
 Thr Cys Pro Pro Ile Arg Gly Leu Arg Pro Val Glu Lys Cys Ala  
 1625 1630 1635

Val Leu Thr Asp His Ile Lys Ala Glu Ala Met Leu Ser Pro Ala  
 1640 1645 1650  
 Gly Ser Ser Trp Asn Ile Asn Pro Ile Ile Val Asp His Tyr Ser  
 1655 1660 1665  
 Cys Ser Leu Thr Tyr Leu Arg Arg Gly Ser Ile Lys Gln Ile Arg  
 1670 1675 1680  
 Leu Arg Val Asp Pro Gly Phe Ile Phe Asp Ala Leu Ala Glu Val  
 1685 1690 1695  
 Asn Val Ser Gln Pro Lys Ile Gly Ser Asn Asn Ile Ser Asn Met  
 1700 1705 1710  
 Ser Ile Lys Ala Phe Arg Pro Pro His Asp Asp Val Ala Lys Leu  
 1715 1720 1725  
 Leu Lys Asp Ile Asn Thr Ser Lys His Asn Leu Pro Ile Ser Gly  
 1730 1735 1740  
 Gly Asn Leu Ala Asn Tyr Glu Ile His Ala Phe Arg Arg Ile Gly  
 1745 1750 1755  
 Leu Asn Ser Ser Ala Cys Tyr Lys Ala Val Glu Ile Ser Thr Leu  
 1760 1765 1770  
 Ile Arg Arg Cys Leu Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Phe Leu Gly  
 1775 1780 1785  
 Glu Gly Ser Gly Ser Met Leu Ile Thr Tyr Lys Glu Ile Leu Lys  
 1790 1800  
 Leu Asn Lys Cys Phe Tyr Asn Ser Gly Val Ser Ala Asn Ser Arg  
 1805 1810 1815  
 Ser Gly Gln Arg Glu Leu Ala Pro Tyr Pro Ser Glu Val Gly Leu  
 1820 1825 1830  
 Val Glu His Arg Met Gly Val Gly Asn Ile Val Lys Val Leu Phe  
 1835 1840 1845  
 Asn Gly Arg Pro Glu Val Thr Trp Val Gly Ser Val Asp Cys Phe  
 1850 1855 1860  
 Asn Phe Ile Val Ser Asn Ile Pro Thr Ser Ser Val Gly Phe Ile  
 1865 1870 1875  
 His Ser Asp Ile Glu Thr Leu Pro Asp Lys Asp Thr Ile Glu Lys  
 1880 1885 1890

Leu Glu Glu Leu Ala Ala Ile Leu Ser Met Ala Leu Leu Leu Gly  
 1895 1900 1905  
 Lys Ile Gly Ser Ile Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Phe Ser Gly  
 1910 1915 1920  
 Asp Phe Val Gln Gly Phe Ile Ser Tyr Val Gly Ser His Tyr Arg  
 1925 1930 1935  
 Glu Val Asn Leu Val Tyr Pro Arg Tyr Ser Asn Phe Ile Ser Thr  
 1940 1945 1950  
 Glu Ser Tyr Leu Val Met Thr Asp Leu Lys Ala Asn Arg Leu Met  
 1955 1960 1965  
 Asn Pro Glu Lys Ile Lys Gln Gln Ile Ile Glu Ser Ser Val Arg  
 1970 1975 1980  
 Thr Ser Pro Gly Leu Ile Gly His Ile Leu Ser Ile Lys Gln Leu  
 1985 1990 1995  
 Ser Cys Ile Gln Ala Ile Val Gly Asp Ala Val Ser Arg Gly Asp  
 2000 2005 2010  
 Ile Asn Pro Thr Leu Lys Lys Leu Thr Pro Ile Glu Gln Val Leu  
 2015 2020 2025  
 Ile Asn Cys Gly Leu Ala Ile Asn Gly Pro Lys Leu Cys Lys Glu  
 2030 2035 2040  
 Leu Ile His His Asp Val Ala Ser Gly Gln Asp Gly Leu Leu Asn  
 2045 2050 2055  
 Ser Ile Leu Ile Leu Tyr Arg Glu Leu Ala Arg Phe Lys Asp Asn  
 2060 2065 2070  
 Gln Arg Ser Gln Gln Gly Met Phe His Ala Tyr Pro Val Leu Val  
 2075 2080 2085  
 Ser Ser Arg Gln Arg Glu Leu Ile Ser Arg Ile Thr Arg Lys Phe  
 2090 2095 2100  
 Trp Gly His Ile Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Lys Leu Ile Asn  
 2105 2110 2115  
 Lys Phe Ile Gln Asn Leu Lys Ser Gly Tyr Leu Ile Leu Asp Leu  
 2120 2125 2130  
 His Gln Asn Ile Phe Val Lys Asn Leu Ser Lys Ser Glu Lys Gln  
 2135 2140 2145

Ile Ile Met Thr Gly Gly Leu Lys Arg Glu Trp Val Phe Lys Val  
 2150 2155 2160

Thr Val Lys Glu Thr Lys Glu Trp Tyr Lys Leu Val Gly Tyr Ser  
 2165 2170 2175

Ala Leu Ile Lys Asp  
 2180

<210> 18  
 <211> 18967  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> plásmido pTM-MVSchw

<400> 18

5

10

```

gcggccgcta atacgactca ctatagggcc aactttgttt ggtctgatga gtccgtgagg      60
acgaaacccg gagtcccggg tcaccaaaca aagttgggta aggatagttc aatcaatgat      120
catcttctag tgcacttagg attcaagatc ctattatcag ggacaagagc aggattaggg      180
atatccgaga tggccacact ttttaaggagc ttagcattgt tcaaaagaaa caaggacaaa      240
ccaccatta catcaggatc cgggtggagcc atcagaggaa tcaaacacat tattatagta      300
ccaatccctg gagattcctc aattaccact cgatccagac ttctggaccg gttggtgagg      360
ttaattggaa acccggatgt gagcgggccc aaactaacag gggcactaat aggtatatta      420
tccttatttg tggagtctcc aggtcaattg attcagagga tcaccgatga ccctgacgtt      480
agcataaggc tgtagagggt tgtccagagt gaccagtcac aatctggcct taccttcgca      540
tcaagaggta ccaacatgga ggatgaggcg gaccaatact tttcacatga tgatccaatt      600
agtagtgatc aatccagggt cggatggttc ggaacaagg aatctcaga tattgaagtg      660
caagaccctg agggattcaa catgattctg ggtaccatcc tagcccaaat ttgggtcttg      720
ctcgcaaagg cggttacggc cccagacacg gcagctgatt cggagctaag aagggtgata      780
aagtacacc aacaaagaag ggtagttggt gaatttagat tggagagaaa atggttggat      840
gtggtgagga acaggattgc cgaggacctc tccttacgcc gattcatggt cgctctaadc      900
ctggatatca agagaacacc cggaaacaaa cccaggattg ctgaaatgat atgtgacatt      960
gatacatata tcgtagaggc aggattagcc agttttatcc tgactattaa gtttgggata     1020
gaaactatgt atcctgctct tggactgcat gaatttgctg gtgagttatc cacacttgag     1080
tccttgatga acctttacca gcaaatgggg gaaactgcac cctacatggt aatcctggag     1140
aactcaattc agaacaagtt cagtgcagga tcataccctc tgctctggag ctatgccatg     1200
ggagtaggag tggaaactga aaactccatg ggaggtttga actttggccg atcttacttt     1260
gatccagcat attttagatt agggcaagag atggttaagga ggtcagctgg aaaggtcagt     1320
tccacattgg catctgaact cggtatcact gccgaggatg caaggcttgt ttcagagatt     1380
    
```

ES 2 423 518 T3

|             |             |             |            |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| gcaatgcata  | ctactgagga  | caagatcagt  | agagcggttg | gacccagaca | agcccaagta  | 1440 |
| tcattttctac | acggtgatca  | aagtgagaat  | gagctaccga | gattgggggg | caaggaagat  | 1500 |
| aggaggggtca | aacagagtcg  | aggagaagcc  | agggagagct | acagagaaac | cgggcccagc  | 1560 |
| agagcaagtg  | atgcgagagc  | tgcccatctt  | ccaaccggca | cacccctaga | cattgacact  | 1620 |
| gcaacggagt  | ccagccaaga  | tccgcaggac  | agtcgaaggt | cagctgacgc | cctgcttagg  | 1680 |
| ctgcaagcca  | tggcaggaat  | ctcggaaaga  | caaggetcag | acacggacac | ccctatagtg  | 1740 |
| tacaatgaca  | gaaatcttct  | agactaggtg  | cgagaggccg | agggccagaa | caacatccgc  | 1800 |
| ctaccatcca  | tcattgttat  | aaaaaactta  | ggaaccaggt | ccacacagcc | gccagcccat  | 1860 |
| caaccatcca  | ctcccacgat  | tggagccaat  | ggcagaagag | caggcacgcc | atgtcaaaaa  | 1920 |
| cggactggaa  | tgcateccggg | ctctcaaggc  | cgagcccatc | ggctcactgg | ccatcgagga  | 1980 |
| agctatggca  | gcatggtcag  | aaatatcaga  | caaccagga  | caggagcgag | ccacctgcag  | 2040 |
| ggaagagaag  | gcaggcagtt  | cgggtctcag  | caaaccatgc | ctctcagcaa | ttggatcaac  | 2100 |
| tgaaggcgggt | gcacctcgca  | tccgcgggtca | gggacctgga | gagagcgatg | acgacgctga  | 2160 |
| aactttggga  | atccccccaa  | gaaatctcca  | ggcatcaagc | actgggttac | agtgttatta  | 2220 |
| cgtttatgat  | cacagcgggtg | aagcgggttaa | gggaatccaa | gatgctgact | ctatcatggt  | 2280 |
| tcaatcaggc  | cttgatgggtg | atagcaccct  | ctcaggagga | gacaatgaat | ctgaaaacag  | 2340 |
| cgatgtggat  | attggcgaac  | ctgataccga  | gggatatgct | atcactgacc | ggggatctgc  | 2400 |
| tcccattctct | atggggttca  | gggttcttga  | tgttgaaact | gcagaaggag | gggagatcca  | 2460 |
| cgagctcctg  | agactccaat  | ccagaggcaa  | caactttccg | aagcttggga | aaactctcaa  | 2520 |
| tgttctctccg | cccccgacc   | ccggtagggc  | cagcacttcc | gggacacca  | ttaaaaaggg  | 2580 |
| cacagacgcg  | agattagcct  | catttggaac  | ggagatcgcg | tctttattga | caggtggtgc  | 2640 |
| aacccaatgt  | gctcgaaagt  | caccctcgga  | accatcaggg | ccaggtgcac | ctgcggggaa  | 2700 |
| tgtccccgag  | tgtgtgagca  | atgccgcact  | gatacaggag | tggacacccg | aatctggtac  | 2760 |
| cacaatctcc  | ccgagatccc  | agaataatga  | agaaggggga | gactattatg | atgatgagct  | 2820 |
| gttctctgat  | gtccaagata  | ttaaaacagc  | cttggccaaa | atacacgagg | ataatcagaa  | 2880 |
| gataatctcc  | aagctagaat  | cactgctggt  | attgaaggga | gaagttgagt | caattaagaa  | 2940 |
| gcagatcaac  | aggcaaaata  | tcagcatatc  | caccctggaa | ggacacctct | caagcatcat  | 3000 |
| gatcgccatt  | cctggacttg  | ggaaggatcc  | caacgacccc | actgcagatg | tcgaaatcaa  | 3060 |
| tcccgacttg  | aaaccatca   | taggcagaga  | ttcaggccga | gactggccg  | aagtctctcaa | 3120 |
| gaaacccggt  | gccagccgac  | aactccaagg  | aatgacaaat | ggacggacca | gttccagagg  | 3180 |
| acagctgctg  | aaggaatttc  | agctaaagcc  | gatcgggaaa | aagatgagct | cagccgctcg  | 3240 |
| gtttgttct   | gacaccggcc  | ctgcatcacg  | cagtgtaatc | cgctccatta | taaaatccag  | 3300 |
| ccggctagag  | gaggatcgga  | agcgttacct  | gatgactctc | cttgatgata | tcaaaggagc  | 3360 |
| caatgatctt  | gccaagttcc  | accagatgct  | gatgaagata | ataatgaagt | agctacagct  | 3420 |

caacttaect gccaacccca tgccagtcga cccaactagt acaacctaaa tccattataa 3480  
 aaaacttagg agcaaagtga ttgcctccca aggtccacaa tgacagagac ctacgacttc 3540  
 gacaagtcgg catgggacat caaagggtcg atcgctccga tacaaccac cacctacagt 3600  
 gatggcaggc tggtgcccca ggtcagagtc atagatcctg gtctaggcga caggaaggat 3660  
 gaatgcttta tgtacatggt tctgctgggg gttggtgagg acagcgattc cctagggcct 3720  
 ccaatcgggc gagcatttgg gttcctgccc ttagggtgtg gcagatccac agcaaagccc 3780  
 gaaaaactcc tcaaagaggc cactgagctt gacatagttg ttagacgtac agcagggctc 3840  
 aatgaaaaac tgggtgttcta caacaacacc cactaactc tcctcacacc ttggagaaag 3900  
 gtcctaacia cagggagtggt cttcaacgca aaccaagtgt gcaatgctgt taatctgata 3960  
 ccgctcgata ccccgagag gttccgtggt gtttatatga gcatcacccg tctttcggat 4020  
 aacgggtatt acaccgttcc tagaagaatg ctggaattca gatcggtaa tgcagtgcc 4080  
 ttcaacctgc tggtgacct taggattgac aaggcgatag gccctgggaa gatcatcgac 4140  
 aatacagagc aacttctga ggcaacattt atggtccaca tcgggaactt caggagaaag 4200  
 aagagtgaag tctactctgc cgattattgc aaaatgaaaa tcgaaaagat gggcctggtt 4260  
 tttgcacttg gtgggatagg gggcaccagt cttcacatta gaagcacagg caaaatgagc 4320  
 aagactctcc atgcacaact cgggttcaag aagaccttat gttaccgct gatggatctc 4380  
 aatgaagacc ttaatcgatt actctggagg agcagatgca agatagtaag aatccaggca 4440  
 gttttgcagc catcagttcc tcaagaattc cgcattttag acgacgtgat cataaatgat 4500  
 gaccaaggac tattcaaagt tctgtagacc gtagtgccca gcaatgcccg aaaacgacct 4560  
 ccctcacaat gacagccaga agggccggac aaaaaagccc cctccgaaag actccacgga 4620  
 ccaagcgaga ggccagccag cagccgacgg caagcgcaa caccaggcgg ccccgacaca 4680  
 gaacagccct gacacaaggc caccaccagc caccccaatc tgcatcctcc tcgtgggacc 4740  
 cccgaggacc aacccccag gctgccccg atccaaacca ccaaccgat cccaccacc 4800  
 cccgggaaag aaacccccag caattggaag gccctcccc ctcttctca acacaagaac 4860  
 tccacaaccg aaccgcacaa gcgaccgagg tgacccaacc gcaggcatcc gactccctag 4920  
 acagatctc tctccccggc aaactaaaca aaacttaggg ccaaggaaca tacacacca 4980  
 acagaacca gacccccggc cacggcgccg cgcccccaac ccccgacaac cagagggagc 5040  
 cccaacca tcccggcggc tccccgggtg cccacaggca gggacacca cccccgaaca 5100  
 gaccagcgc ccaaccatcg acaatccaag acgggggggc cccccaaaa aaaggcccc 5160  
 aggggcccag agccagcacc gcgaggaagc ccaccacc caccacgac cacggcaacc 5220  
 aaaccagaac ccagaccacc ctgggcccacc agctcccaga ctcggccatc accccgcaga 5280  
 aaggaaaggc cacaacccgc gcaccccagc cccgatccgg cggggagcca cccaacccga 5340  
 accagcacc aagagcgatc cccgaaggac cccgaaccg caaaggacat cagtatccca 5400  
 cagcctctcc aagtccccg gtctctcct cttctcgaag ggaccaaag atcaatccac 5460

ES 2 423 518 T3

cacacccgac gacactcaac tccccacccc taaaggagac accggaatc ccagaatcaa 5520  
gactcatcca atgtccatca tgggtctcaa ggtgaacgtc tctgccatat tcatggcagt 5580  
actgttaact ctccaaacac ccaccgggca aatccattgg ggcaatctct ctaagatagg 5640  
ggtggttagga ataggaagtg caagctacaa agttatgact cgttccagcc atcaatcatt 5700  
agtcataaaa ttaatgcca atataactct cctcaataac tgcacgaggg tagagattgc 5760  
agaatacagg agactactga gaacagtttt ggaaccaatt agagatgcac ttaatgcaat 5820  
gacccagaat ataagaccgg ttcagagtgt agcttcaagt aggagacaca agagatttgc 5880  
gggagtagtc ctggcaggtg cggccctagg cgttgccaca gctgctcaga taacagccgg 5940  
cattgcactt caccagtcca tgctgaactc tcaagccatc gacaatctga gagcgcacct 6000  
ggaaactact aatcaggcaa ttgagacaat cagacaagca gggcaggaga tgatattggc 6060  
tgttcagggt gtccaagact acatcaataa tgagctgata ccgtctatga accaactatc 6120  
ttgtgattta atcggccaga agctcgggct caaattgtct agatactata cagaaatcct 6180  
gtcattatft ggccccagtt tacgggaccc catatctgcg gagatatcta tccaggcttt 6240  
gagctatgcg cttggaggag acatcaataa ggtgttagaa aagctcggat acagtggagg 6300  
tgatttactg ggcattctag agagcggagg aataaaggcc cggataactc acgtcgacac 6360  
agagtcctac ttcattgtcc tcagtatagc ctatccgacg ctgtccgaga ttaagggggt 6420  
gattgtccac cggctagagg gggctctgta caacataggc tctcaagagt ggtataccac 6480  
tgtgccaag tatgttgcaa cccaagggtta ccttatctcg aattttgatg agtcatcgtg 6540  
tactttcatg ccagagggga ctgtgtgacg ccaaatgcc ttgtaccga tgagtcctct 6600  
gctccaagaa tgcctcggg ggtacaccaa gtctgtgct cgtacactcg tatccgggtc 6660  
ttttgggaac cggttcattt tatcacaagg gaacctata gccatttggt catcaatcct 6720  
ttgcaagtgt tacacaacag gaacgatcat taatcaagac cctgacaaga tccaacata 6780  
cattgctgcc gatcactgcc cggtagtcca ggtgaacggc gtgaccatcc aagtcgggag 6840  
caggaggtat ccagacgctg tgtacttgca cagaattgac ctcggtcctc ccatatcatt 6900  
ggagaggtg gacgtaggga caaatctggg gaatgcaatt gctaagttgg aggatgcaa 6960  
ggaattgttg gagtcatcgg accagatatt gaggagtatg aaaggtttat cgagcactag 7020  
catagtctac atcctgattg cagtgtgtct tggagggttg atagggatcc ccgctttaat 7080  
atgttgctgc agggggcggt gtaacaaaaa gggagaacaa gttggtatgt caagaccagg 7140  
cctaaagcct gatcttacgg gaacatcaaa atcctatgta aggtcgtctc gatcctctac 7200  
aactcttgaa acacaaatgt cccacaagtc tctcttctgt catcaagcaa ccaccgacc 7260  
cagcatcaag cccacctgaa attatctccg gcttccctct ggccgaacaa tatcggtagt 7320  
taatcaaaac ttagggtgca agatcatcca caatgtcacc acaacgagac cggataaatg 7380  
ccttctacaa agataacccc catcccaagg gaagtaggat agtcattaac agagaacatc 7440  
ttatgattga tagaccttat gttttgctgg ctgttctggt tgatcatggt ctgagcctga 7500



|            |             |            |             |            |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| tcgggttgct | agccattgca  | ggcattagac | ttcatcgggc  | agccatctac | accgcagaga  | 7560 |
| tccataaaag | cctcagcacc  | aatctagatg | taactaactc  | aatcgagcat | caggtcaagg  | 7620 |
| acgtgctgac | accactcttc  | aaaatcatcg | gtgatgaagt  | gggcctgagg | acacctcaga  | 7680 |
| gattcactga | cctagtgaaa  | ttaatctctg | acaagattaa  | attccttaat | ccggataggg  | 7740 |
| agtacgactt | cagagatctc  | acttggtgta | tcaacccgcc  | agagagaatc | aaattggatt  | 7800 |
| atgatcaata | ctgtgcagat  | gtggctgctg | aagagctcat  | gaatgcattg | gtgaactcaa  | 7860 |
| ctctactgga | gaccagaaca  | accaatcagt | tcctagctgt  | ctcaaagga  | aaactgctcag | 7920 |
| ggcccactac | aatcagaggt  | caattctcaa | acatgtcgtc  | gtccctgtta | gacttgatt   | 7980 |
| taggtcgagg | ttacaatgtg  | tcactatag  | tcactatgac  | atcccaggga | atgtatgggg  | 8040 |
| gaacttacct | agtggaaaag  | cctaactgga | gcagcaaaaag | gtcagagttg | tcacaactga  | 8100 |
| gcatgtaccg | agtgtttgaa  | gtaggtgtta | tcagaaatcc  | gggtttgggg | gctccggtgt  | 8160 |
| tccatatgac | aaactatctt  | gagcaaccag | tcagtaatga  | tctcagcaac | tgtatggtgg  | 8220 |
| ctttggggga | gctcaaactc  | gcagcccttt | gtcacgggga  | agattctatc | acaattccct  | 8280 |
| atcagggatc | agggaaaggt  | gtcagcttcc | agctcgtcaa  | gctaggtgtc | tggaaatccc  | 8340 |
| caaccgacat | gcaatcctgg  | gtcccttat  | caacggatga  | tccagtgata | gacaggcttt  | 8400 |
| acctctcctc | tcacagaggt  | gttatcgtg  | acaatcaagc  | aaaatgggct | gtcccgacaa  | 8460 |
| cacgaacaga | tgacaagttg  | cgaatggaga | catgcttcca  | acaggcgtgt | aagggtaaaa  | 8520 |
| tccaagcact | ctgcgagaat  | cccagtgagg | caccattgaa  | ggataacagg | attccttcat  | 8580 |
| acggggtctt | gtctgttgat  | ctgagctgga | cagttgagct  | taaaatcaaa | attgcttcgg  | 8640 |
| gattcgggcc | attgatcaca  | cacggttcag | ggatggacct  | atacaaatcc | aaccacaaca  | 8700 |
| atgtgtattg | gctgactatc  | ccgccaatga | agaacctagc  | cttaggtgta | atcaacacat  | 8760 |
| tggagtggat | accgagattc  | aaggttagtc | cctacctctt  | cactgtccca | attaaggaag  | 8820 |
| caggcgaaga | ctgccatgcc  | ccaacatacc | tacctgcgga  | ggtggatggt | gatgtcaaac  | 8880 |
| tcagttccaa | tctggtgatt  | ctacctggtc | aagatctcca  | atatgttttg | gcaacctacg  | 8940 |
| atacttccag | ggttgaacat  | gctgtggttt | attacgttta  | cagcccaagc | cgctcatttt  | 9000 |
| cttactttta | tccttttagg  | ttgcctataa | agggggtccc  | catcgaatta | caagtggaat  | 9060 |
| gcttcacatg | ggaccaaaaa  | ctctggtgcc | gtcacttctg  | tgtgcttgcg | gactcagaat  | 9120 |
| ctggtggaca | tatcactcac  | tctgggatgg | tgggcatggg  | agtcagctgc | acagtcaccc  | 9180 |
| gggaagatgg | aaccaatcgc  | agatagggct | gctagtgaac  | caatcacatg | atgtcaccca  | 9240 |
| gacatcaggc | ataccacta   | gtgtgaaata | gacatcagaa  | ttaagaaaaa | cgtagggtcc  | 9300 |
| aagtggttcc | ccgttatgga  | ctcgctatct | gtcaaccaga  | tcttataccc | tgaagttcac  | 9360 |
| ctagatagcc | cgatagttac  | caataagata | gtagccatcc  | tggagtatgc | tcgagtcctt  | 9420 |
| cacgcttaca | gcctggagga  | ccctacactg | tgtcagaaca  | tcaagcaccg | cctaaaaaac  | 9480 |
| ggattttcca | accaaattgat | tataacaat  | gtggaagttg  | ggaatgtcat | caagtccaag  | 9540 |

cttaggagtt atccggccca ctctcatatt ccatatccaa attgtaatca ggatttattt 9600  
 aacatagaag acaaaagagtc aacgaggaag atccgtgaac tcctcaaaaa ggggaattcg 9660  
 ctgtactcca aagtcagtga taaggttttc caatgcttaa gggacactaa ctacaggctt 9720  
 ggcctaggct ccgaattgag ggaggacatc aaggagaaaag ttattaactt gggagtttac 9780  
 atgcacagct cccagtgggt tgagcccttt ctgttttgggt ttacagtcaa gactgagatg 9840  
 aggtcagtga ttaaatacaca aaccatact tgccatagga ggagacacac acctgtattc 9900  
 ttcactggta gttcagttga gttgctaate tctcgtgacc ttgttgctat aatcagtaaa 9960  
 gagtctcaac atgtatatta cctgacattt gaactggttt tgatgtattg tgatgtcata 10020  
 gaggggaggt taatgacaga gaccgctatg actattgatg ctaggtatac agagcttcta 10080  
 ggaagagtca gatacatgtg gaaactgata gatggtttct tccctgact cgggaatcca 10140  
 acttatcaaa ttgtagccat gctggagcct ctttcacttg cttacctgca gctgagggat 10200  
 ataacagtag aactcagagg tgctttcctt aaccactgct ttactgaaat acatgatgtt 10260  
 cttgacaaa acgggttttc tgatgaagggt acttatcatg agttaactga agctctagat 10320  
 tacattttca taactgatga catacatctg acaggggaga ttttctcatt tttcagaagt 10380  
 ttcggccacc ccagacttga agcagtaacg gctgctgaaa atgttaggaa atacatgaat 10440  
 cagcctaaag tcattgtgta tgagactctg atgaaaggtc atgccatatt ttgtggaatc 10500  
 ataatacaacg gctatcgtga caggcacgga ggcagttggc caccgctgac cctccccctg 10560  
 catgctgcag acacaatccg gaatgctcaa gcttcagggtg aagggttaac acatgagcag 10620  
 tgcgttgata actggaaatc ttttgctgga gtgaaatttg gctgctttat gcctcttagc 10680  
 ctggatagtg atctgacaat gtacctaaag gacaaggcac ttgctgctct ccaaagggaa 10740  
 tgggattcag tttacccgaa agagtccctg cgttacgacc ctccaaggg aaccgggtca 10800  
 cggaggcttg tagatgtttt ccttaatgat tcgagctttg acctatga tgtgataatg 10860  
 tatgttgtaa gtggagctta cctccatgac cctgagttca acctgtctta cagcctgaaa 10920  
 gaaaaggaga tcaaggaaac aggtagactt tttgctaaaa tgacttaca aatgagggca 10980  
 tgccaagtga ttgctgaaaa tctaactca aacgggattg gcaaatattt taaggacaat 11040  
 gggatggcca aggatgagca cgatttgact aaggcactcc aactctagc tgtctcagga 11100  
 gtcccaaaag atctcaaaga aagtcacagg ggggggcccag tcttaaaaac ctactcccga 11160  
 agcccagtcc acacaagtac caggaacgtg agagcagcaa aagggtttat agggttccct 11220  
 caagtaattc ggcaggacca agacactgat catccggaga atatggaagc ttacgagaca 11280  
 gtcagtgcac ttatcacgac tgatctcaag aagtactgcc ttaattggag atatgagacc 11340  
 atcagcttgt ttgcacagag gctaaatgag atttacggat tgccctcatt tttccagtgg 11400  
 ctgcataaga ggcttgagac ctctgtcctg tatgtaagtg accctcattg ccccccgac 11460  
 cttgacgccc atatcccgtt atataaagtc cccaatgatc aaatcttcat taagtaccct 11520  
 atgggaggta tagaagggta ttgtcagaag ctgtggacca tcagaccat tccctatcta 11580

tacctggctg cttatgagag cggagtaagg attgcttcgt tagtgcaagg ggacaatcag 11640  
 accatagccg taacaaaaag ggtaccagc acatggccct acaacctta gaaacgggaa 11700  
 gctgctagag taactagaga ttactttgta attccttaggc aaaggctaca tgatattggc 11760  
 catcacctca aggcaaatga gacaattggt tcatcacatt tttttgtcta ttcaaaagga 11820  
 atatattatg atgggctact tgtgtcccaa tcaactcaaga gcatcgcaag atgtgtattc 11880  
 tggtcagaga ctatagttga tgaacaagg gcagcatgca gtaatattgc tacaacaatg 11940  
 gctaaaagca tcgagagagg ttatgaccgt taccttgcatt attccctgaa cgtcctaaaa 12000  
 gtgatacagc aaattctgat ctctcttggc ttcacaatca attcaacct gacccgggat 12060  
 gtagtcatac cctcctcac aaacaacgac ctcttaataa ggatggcact gttgcccgtc 12120  
 cctattgggg ggatgaatta tctgaatatg agcaggctgt ttgtcagaaa catcgggtgat 12180  
 ccagtaacat catcaattgc tgatctcaag agaatgattc tcgcctcact aatgcctgaa 12240  
 gagaccctcc atcaagtaat gacacaacaa ccgggggact cttcattcct agactgggct 12300  
 agcgaccctt actcagcaaa tcttgtatgt gtccagagca tcaactagact cctcaagaac 12360  
 ataactgcaa ggtttgcct gatccatagt ccaaaccaa tgtaaaaagg attattccat 12420  
 gatgacagta aagaagagga cgagggactg gcggcattcc tcatggacag gcatattata 12480  
 gtacctaggg cagctcatga aatcctggat catagtgtca caggggcaag agagtctatt 12540  
 gcaggcatgc tggataccac aaaaggcttg attcgagcca gcatgaggaa ggggggggta 12600  
 acctctcgag tgataaccag attgtccaat tatgactatg aacaattcag agcagggatg 12660  
 gtgctattga caggaagaaa gagaaatgtc ctcatgaca aagagtcatg ttcagtgcag 12720  
 ctggcgagag ctctaagaag ccatatgtgg gcgaggctag ctcgaggacg gcctatttac 12780  
 ggccttgagg tccctgatgt actagaatct atgcgaggcc accttattcg gcgtcatgag 12840  
 acatgtgtca tctgcgagtg tggatcagtc aactacggat ggttttttgt cccctcgggt 12900  
 tgccaactgg atgatattga caaggaaaca tcatcctga gagtcccata tattggttct 12960  
 accactgatg agagaacaga catgaagctt gccttcgtaa gagcccaag tcgatccttg 13020  
 cgatctgctg ttagaatagc aacagtgtac tcatgggctt acggtgatga tgatagctct 13080  
 tggaaacgaag cctggttgtt ggctaggcaa agggccaatg tgagcctgga ggagctaagg 13140  
 gtgatcactc ccatctcaac ttcgactaat ttagcgcata ggttgagga tcgtagcact 13200  
 caagtgaat actcaggtac atcccttgtc cgagtggcga ggtataccac aatctccaac 13260  
 gacaatctct catttgtcat atcagataag aaggttgata ctaactttat ataccaaca 13320  
 ggaatgcttc tagggttggg tgtttttagaa acattgtttc gactcgagaa agataccgga 13380  
 tcatctaaca cggattaca tcttcacgtc gaaacagatt gttgcgtgat cccgatgata 13440  
 gatcatccca ggataccag ctcccgaag ctagagctga gggcagagct atgtaccaac 13500  
 ccattgatat atgataatgc acctttaatt gacagagatg caacaaggct atacaccag 13560  
 agccatagga ggcaccttgt ggaatttgtt acatggcca caccccaact atatcacatt 13620

ttagctaagt ccacagcact atctatgatt gacctggtaa caaaatttga gaaggaccat 13680  
 atgaatgaaa tttcagctct cataggggat gacgatatca atagtttcat aactgagttt 13740  
 ctgctcatag agccaagatt attcactatc tacttgggcc agtgtgcggc catcaattgg 13800  
 gcatttgatg tacattatca tagaccatca gggaaatatac agatgggtga gctgttgca 13860  
 tcgttccttt ctagaatgag caaaggagtg ttaaggtgc ttgtcaatgc tctaagccac 13920  
 ccaaagatct acaagaaatt ctggcattgt ggtattatag agcctatcca tggccttca 13980  
 cttgatgctc aaaacttgca cacaactgtg tgcaacatgg tttacacatg ctatatgacc 14040  
 tacctcgacc tgttggtgaa tgaagagtta gaagagttca catttctctt gtgtgaaagc 14100  
 gacgaggatg tagtaccgga cagattcgac aacatccagg caaaacactt atgtgttctg 14160  
 gcagatttgt actgtcaacc agggacctgc ccaccaattc gaggtctaag accggtagag 14220  
 aatgtgcag ttctaaccga ccatatcaag gcagaggcta tgttatctcc agcaggatct 14280  
 tcgtggaaca taaatccaat tattgtagac cattactcat gctctctgac ttatctccgg 14340  
 cgaggatcga tcaaacagat aagattgaga gttgatccag gattcatttt cgacgccctc 14400  
 gctgaggtaa atgtcagtca gccaaagatc ggcagcaaca acatctcaa tatgagcatc 14460  
 aaggctttca gacccccaca cgatgatgtt gcaaaattgc tcaaagatat caacacaagc 14520  
 aagcacaatc ttcccatttc agggggcaat ctcgccatt atgaaatcca tgctttccgc 14580  
 agaatcgggt tgaactcatc tgcttgctac aaagctgttg agatatcaac attaattagg 14640  
 agatgccttg agccagggga ggacggcttg ttcttgggtg agggatcggg ttctatggtg 14700  
 atcacttata aagagatact taaactaac aagtgttct ataatagtgg ggtttccgcc 14760  
 aattctagat ctggtcaaag ggaattagca ccctatccct ccgaagtgg ccttgtcgaa 14820  
 cacagaatgg gagtaggtaa tattgtcaa gtgctcttta acgggaggcc cgaagtcacg 14880  
 tgggtaggca gtgtagattg cttcaatttc atagttagta atatccctac ctctagtgtg 14940  
 gggtttatcc attcagatat agagacctg cctgacaaag atactataga gaagctagag 15000  
 gaattggcag ccatcttatac gatggctctg ctctgggca aaataggatc aatactggtg 15060  
 attaagctta tgcccttcag cggggatttt gttcagggat ttataagtta tgtagggtct 15120  
 cattatagag aagtgaacct tgtataccct agatacagca acttcatctc tactgaaact 15180  
 tatttggtta tgacagatct caaggctaac cggctaata atcctgaaa gattaagcag 15240  
 cagataattg aatcatctgt gaggacttca cctggactta taggtcacat cctatccatt 15300  
 aagcaactaa gctgcataca agcaattgtg ggagacgcag ttagtagagg tgatatcaat 15360  
 cctactctga aaaaacttac acctatagag caggtgctga tcaattgcgg gttggcaatt 15420  
 aacggacctc agctgtgcaa agaattgatc caccatgatg ttgcctcagg gcaagatgga 15480  
 ttgcttaatt ctatactcat cctctacagg gagttggcaa gattcaaaga caaccaaaaga 15540  
 agtcaacaag ggatgttcca cgcttaccct gtattggtaa gtagcaggca acgagaactt 15600  
 atatctagga tcacccgcaa attctggggg cacattcttc tttactccgg gaacaaaaag 15660

ttgataaata agtttatcca gaatctcaag tccggctatc tgatactaga cttacaccag 15720  
 aatatcttcg ttaagaatct atccaagtca gagaacaga ttattatgac ggggggtttg 15780  
 aaacgtgagt gggtttttaa ggtaacagtc aaggagacca aagaatggta taagttagtc 15840  
 ggatacagtg ccctgattaa ggactaattg gttgaactcc ggaaccctaa tctgccccta 15900  
 ggtggtagg cattatctgc aatatattaa agaaaacttt gaaaatacga agtttctatt 15960  
 cccagctttg tctggtggcc ggcatggtcc cagcctcctc gctggcgccg gctgggcaac 16020  
 attccgaggg gaccgtcccc tcggtaatgg cgaatgggac gcggccgac cggctgctaa 16080  
 caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc 16140  
 ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg tttttgtctg aaaggaggaa ctatatccgg 16200  
 atgcggccgc gggccctatg gtaccagct tttgtccct ttagtgaggg ttaattccga 16260  
 gcttggcgta atcatggtca tagctgttcc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc 16320  
 cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggcgcctaa tgagttaggt 16380  
 aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 16440  
 agctgatta atgaatcggc caacgcgagg ggagagggc tttgcgtatt gggcgtctt 16500  
 ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag 16560  
 ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca 16620  
 tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggtg ctggcgttt 16680  
 tccataggtc cggccccct gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 16740  
 gaaacccgac aggactataa agataccagg cgttcccccc tggagctcc ctcgtgcgct 16800  
 ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctcctc tcgggaagcg 16860  
 tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca 16920  
 agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcccctta tccggtaact 16980  
 atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 17040  
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta 17100  
 actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgctc tctgctgaag ccagttacct 17160  
 tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaaac caccgctggt agcggtggtt 17220  
 ttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 17280  
 tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta 17340  
 tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat 17400  
 caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagttagg 17460  
 cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactg cccgtcgtgt 17520  
 agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgagc 17580  
 acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc 17640  
 gcagaagtgg tcttgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 17700

ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca 17760  
 tcgtgggtgc acgctcgtcg tttgggatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa 17820  
 ggcgagttac atgatcccc atgttgatgaa aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga 17880  
 tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat gcttatggca gactgcata 17940  
 attctcttac tgcctatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca 18000  
 agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 18060  
 ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg 18120  
 ggcgaaaaet ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 18180  
 cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag 18240  
 gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac 18300  
 tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcggataca 18360  
 tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag 18420  
 tgccaccta aattgtaaac gttaatattt tgtaaaatt cgcgttaaat tttgtttaa 18480  
 tcagctcatt ttttaacca taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaagaat 18540  
 agaccgagat aggggtgagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg 18600  
 tggactcaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac 18660  
 catcaccta atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta 18720  
 aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag 18780  
 ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg 18840  
 taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgctcccat tcgccattca 18900  
 ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgccggcctc ttcgctatta cgccagccac 18960  
 cgcggtg 18967

5 <210> 19  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador AttB1-T7Pol  
 <400> 19

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc caccatggaa ttctctgaca tcgaactggc. 60  
 t 61

15 <210> 20  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt atcacgcgaa cgcgaagtcc gactctaaga 60  
 tgtc 64

ES 2 423 518 T3

<220>  
 <223> Cebador AttB2-retourT7Pol  
  
 <400> 20  
 5  
 <210> 21  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador AttBI-SV40nls  
  
 <400> 21  
 15  
**ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc caccatggca ccaaaaaaga agagaaaggt 60**  
**a 61**  
  
 <210> 22  
 <211> 58  
 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador AttBI-N  
 25  
 <400> 22  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc catggccaca ctttaagga gcttagca 58  
  
 <210> 23  
 <211> 60  
 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador AttB2-N  
 35  
 <400> 23  
 gggaccactt tgtacaagaa agctgggtgt gtactagtct agaagatttc tgcattgta 60  
  
 <210> 24  
 <211> 55  
 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador AttB1-P  
 45  
 <400> 24  
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc catggcagaa gagcaggcac gccat 55  
 50  
 <210> 25  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador AttB2-P  
  
 <400> 25  
 60  
**ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ttactacttc attattatct tcatcagcat 60**  
**ctggtgga 68**

## REIVINDICACIONES

1. Una célula que produce de forma estable a partir de ácido o ácidos nucleicos integrados en su genoma al menos una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos, en el que dicho ácido o ácidos nucleicos es al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N, al menos una copia de un ácido o ácidos nucleicos que codifican una proteína P y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con el ácido o ácidos nucleicos que codifican estas al menos ARN polimerasa, nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) o derivados funcionales de los mismos, y en el que dichos derivados funcionales de la ARN polimerasa y/o nucleoproteína (N) y/o fosfoproteína (P) se definen como variantes de la ARN polimerasa y/o de la proteína N y/o de la proteína P que mantienen actividad de la proteína a partir de la cual se obtienen, como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP), funcional en transcripción y replicación en un genoma de virus, en un sistema de rescate que posibilita la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada a partir de ADNc clonado, estando dichas variantes codificadas por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad (solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación del 50% de formamida, 6X SSC a 42° C y condiciones de lavado a 68° C, 0,2X SSC y el 0,1% de SDS) con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo silvestre, la proteína N y la proteína P de una cepa o virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada;

b) un ácido nucleico que presenta al menos el 80%, preferentemente el 90%, más preferentemente el 95% o incluso el 99% de similitud con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo silvestre, la proteína N o la proteína P, calculándose dicha similitud a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias; y

c) un ácido nucleico que difiere del ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de tipo silvestre, la proteína N o la proteína P en al menos un nucleótido, opcionalmente sustitución conservativa, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, en al menos una supresión o adición de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 supresiones o adiciones de nucleótido;

o siendo un fragmento que representa al menos el 70%, particularmente el 80% y más particularmente el 90% o incluso el 95% de la ARN polimerasa de longitud completa, proteína N o proteína P.

2. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la producción estable no se produce como resultado de una selección de fármaco.

3. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende integrado en su genoma:

a. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa bajo el control de elemento o elementos reguladores de transcripción,

b. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de elemento o elementos reguladores de transcripción, y

c. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de elemento o elementos reguladores de transcripción.

4. Una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con:

a. un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa,

b. un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y

c. un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

5. Una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con un vector de expresión que comprende:

a. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa.

b. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de sentido negativo no segmentada.

c. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y

d. un ADN solapado.



6. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las proteínas N y P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son del mismo virus.
- 5 7. Una célula de acuerdo con la reivindicaciones 6, en la que las proteínas N y P son de la misma cepa de virus o de diferentes cepas de virus.
8. Una célula de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que las proteínas N y P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son de diferentes virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.
- 10 9. Una célula de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las proteínas N y P de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son de un virus MV atenuado, particularmente cepa Schwarz MV.
10. Una célula de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el promotor es un promotor CMV.
- 15 11. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la ARN polimerasa es la ARN polimerasa de fago T7 o su forma nuclear (nlsT7).
12. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el ADN solapado se obtiene a partir de un retrovirus.
- 20 13. Una célula de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el ADN solapado se obtiene a partir de un lentivirus, particularmente un lentivirus humano.
14. Una célula de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el ADN solapado se obtiene a partir de un virus de VIH, CAEV, EIAV, VISNA, SIV o FIV.
- 25 15. Una célula de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el ADN solapado se obtiene a partir de VIH-1 o VIH-2.
16. Una célula de acuerdo con la reivindicación 4 o una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, en la que los vectores son:
- 30 a. el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-T7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3702 o el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-nlsT7, depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3703.
- 35 b. el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-N depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3700, y
- c. el plásmido HIV-1-TRIP $\Delta$ U3.CMV-P depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3701.
- 40 17. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, la cual es una célula eucariota.
18. Una célula de acuerdo con la reivindicación 17, la cual es una célula de mamífero.
19. Una célula de acuerdo con la reivindicación 18, la cual es una célula humana.
- 45 20. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que puede dividirse.
21. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, la cual es una célula HEK 293 (riñón embrionario humano).
- 50 22. Una célula de acuerdo con la reivindicación 21, la cual es una línea de células 293-T7-NP depositada en el CNCM el 14 de junio de 2006 con el número I-3618.
23. Una célula de acuerdo con la reivindicación 21, la cual es la línea de células 293-nlsT7-NP MV depositada en el CNCM el 4 de agosto de 2006, con el número I-3662.
- 55 24. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que no se puede dividir.
25. Una célula de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende integrada en su genoma al menos una copia de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, opcionalmente bajo el control de elementos reguladores de transcripción.
- 60 26. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, recombinada adicionalmente por un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.
- 65

27. Una célula de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.
- 5 28. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en la que las proteínas N, P y L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son del mismo virus.
29. Una célula de acuerdo con la reivindicación 28, en la que las proteínas N, P y L son de la misma cepa de virus o de cepas de virus diferentes.
- 10 30. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en la que las proteínas N, P y L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son de diferentes virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.
- 15 31. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en la que la proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus MV, particularmente de una cepa Schwarz MV.
32. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, recombinada adicionalmente con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada.
- 20 33. Una célula de acuerdo con la reivindicación 32, en la que la secuencia de dicho clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada se modifica mediante inserción en lugar o lugares permisivos de ácido o ácidos nucleicos heterólogos.
- 25 34. Un cultivo celular que está compuesto de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33.
35. Un cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 34, el cual es un cultivo primario.
- 30 36. Un cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 34, el cual es una línea celular.
37. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que comprende o consiste en:
- 35 a. recombinar una célula o un cultivo de células que produce de manera estable a partir de ácido o ácidos nucleicos integrados en su genoma una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, en el que dicho ácido o ácidos nucleicos es al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con el ácido o ácidos nucleicos que codifican estas ARN polimerasa, nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1, con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada,
- 40 b. transferir dicha célula recombinante o cultivo de células recombinantes a células con capacidad para mantener la replicación y producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
- 45 c. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, infeccioso, recombinante a partir del co-cultivo de la etapa b.
- 50 38. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que comprende o consiste en:
- 55 a. recombinar una célula o un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada,
- 60 b. transferencia de dicha célula recombinante o cultivo de células recombinantes a células con capacidad para mantener la replicación y producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y
- c. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir del co-cultivo de la etapa b.
- 65 39. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que comprende o consiste en:

- 5 a. recombinar una célula o un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada y,  
 b. transferencia de una célula recombinante o cultivo de células recombinantes a células con capacidad para mantener la replicación y producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y  
 c. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir del co-cultivo de la etapa b.
- 10 40. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en el que dicho cultivo de células es la línea de células 293-T7-NP depositada en el CNCM el 14 de junio de 2006 con el número I-3618 o la línea de células 293-nlsT7-NP MV depositada en el CNCM el 4 de agosto de 2006, con el número I-3662.
- 15 41. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, en el que dichas células competentes en la etapa b son células Vero (riñón de mono verde Africano), células CEF (fibroblastos embrionarios de pollo) o células MRC5.
- 20 42. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que comprende o consiste en:  
 a. recombinar una célula o un cultivo de células que produce de manera estable a partir de ácido o ácidos nucleicos integrados en su genoma una ARN polimerasa, una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, en el que dicho ácido o ácidos nucleicos es al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con el ácido o ácidos nucleicos que codifican estas ARN polimerasa, nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1, con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y  
 b. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de la célula recombinante o cultivo de células recombinantes.
- 25  
 30
- 35 43. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que comprende o consiste en:  
 a. recombinar una célula de cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, con clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y  
 b. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de dicha célula recombinante o cultivo de células recombinantes.
- 40  
 45
44. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que comprende o consiste en:  
 a. recombinar una célula o un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y  
 b. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de la célula recombinante o cultivo de células recombinantes.
- 50  
 55
45. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, en el que dicha célula o cultivo de células es un cultivo de células eucariotas, particularmente un cultivo de células de mamífero o un cultivo de células humanas.
- 60 46. Método de acuerdo con la reivindicación 45, en el que dicho cultivo celular es fibroblastos humanos, especialmente la línea de células MRC5 (fibroblastos de pulmón humano).
- 65 47. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 46, en la que la secuencia de nucleótidos de dicho clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada se modifica mediante inserción, en lugares permisivos, de al menos un ácido o ácidos nucleicos heterólogos.

48. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 47, en el que dicho ácido nucleico heterólogo codifica epítomos o poliepítomos.

5 49. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 48, en el que dicho clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada modificado de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus MV atenuado, particularmente la cepa MV Schwarz.

10 50. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1, en la dichas ARN polimerasa de tipo silvestre, proteína N y proteína P tienen una secuencia como se define en SEC ID N°: 9, 13 y 15, respectivamente.

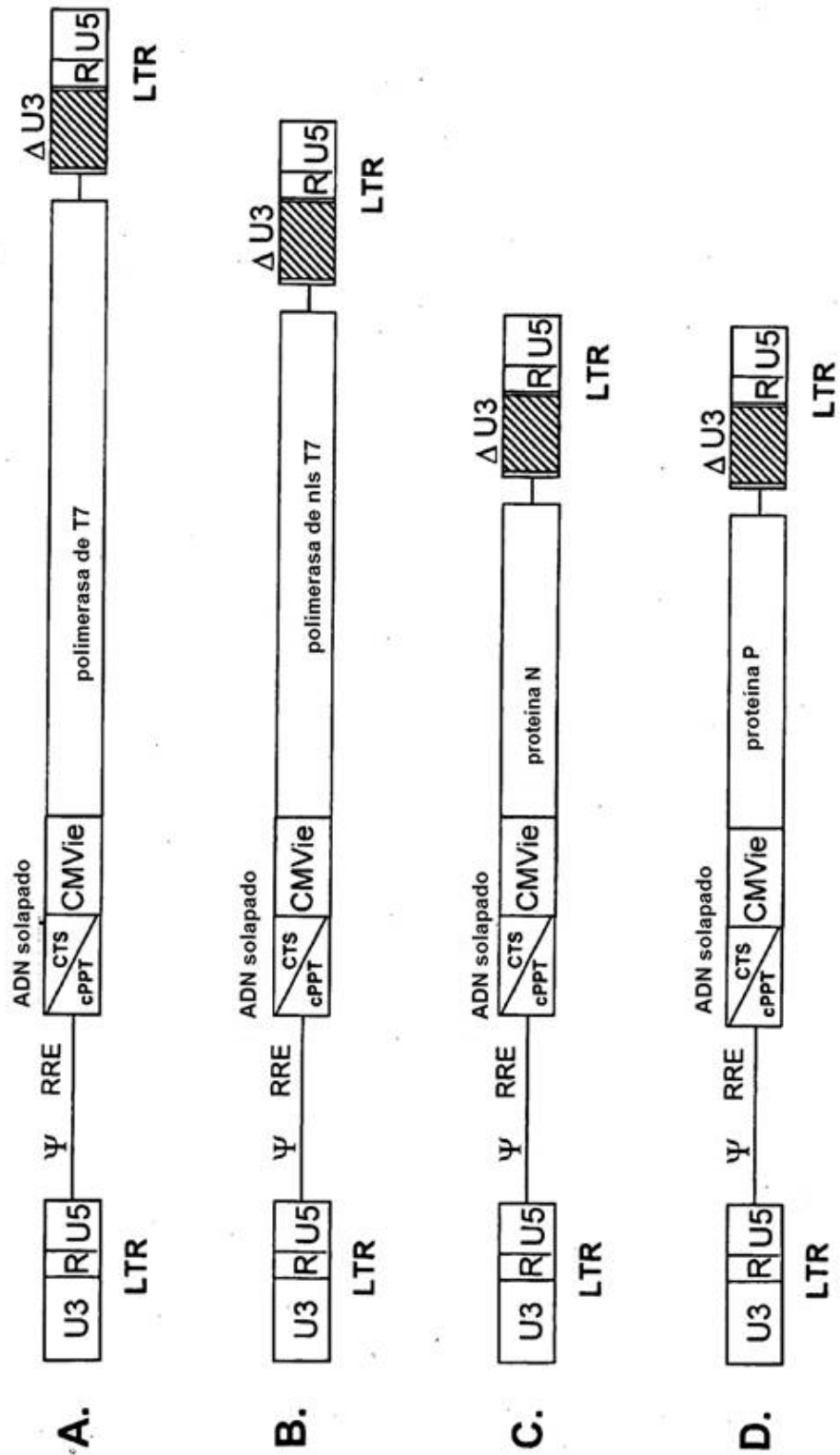
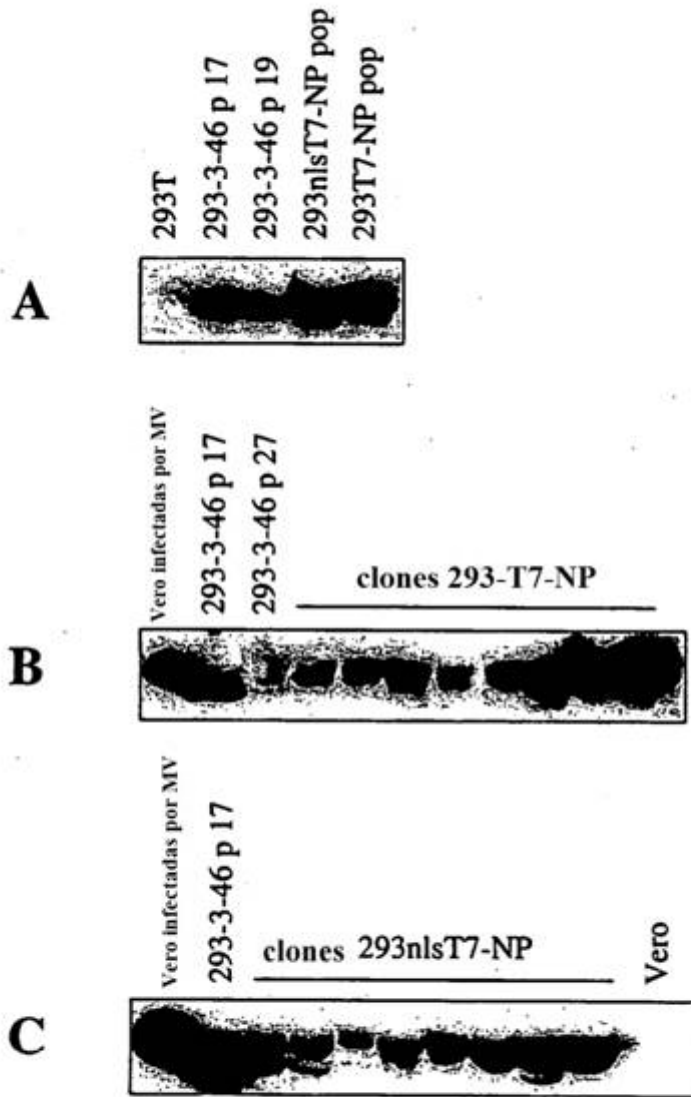


Fig. 1



**Fig. 2**