

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 610**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2010 PCT/EE2010/000010**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11144216**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10720259 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2571998**

54 Título: **Método y kit para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del virus del papiloma humano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2017

73 Titular/es:

**ICOSAGEN CELL FACTORY OÜ (100.0%)
Eerika tee 1, Össu küla, Ülenurme vald
61713 Tartu maakond, EE**

72 Inventor/es:

**USTAV, MART;
USTAV, ENE;
GEIMANEN, JELIZAVETA;
PIPITS, REGINA;
ISOK-PAAS, HELEN;
REINSON, TORMI;
USTAV, MART, JR.;
LAOS, TRIIN;
ORAV, MARIT;
SALK, KRISTIINA;
MÄNNIK, ANDRES y
REMM, ANU**

74 Agente/Representante:

DIÉGUEZ GARBAYO, Pedro

ES 2 643 610 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).

Método y kit para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del virus del papiloma humano

5

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere a campos de virología, biología celular, cultivo celular y desarrollo de fármacos. Más particularmente, la invención proporciona un método para el cribado de sustancias anti-HPV y un kit para cribado de sustancias anti-VPH

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El interés continuo para estudiar el virus del papiloma humano (VPH) se ha generado por su asociación con cánceres humanos específicos. El VPH infecta las células proliferantes basales del epitelio e induce la formación de tumores benignos.

20

En algunos casos, esta infección puede conducir a la progresión y la formación de carcinomas malignos. El virión completo del virus del papiloma constituye un revestimiento proteico (cápside) que rodea un ADN circular de doble capa organizado en regiones codificantes y no codificantes. En la región codificante de papilomavirus se han identificado ocho marcos de lectura abiertos (E1-E8) y dos ORF tardías (L1, L2). Las primeras ORFs codifican proteínas implicadas en la replicación del ADN viral durante el establecimiento, en estado de mantenimiento continuo y amplificación tardía (E1 y E2), en la regulación de la expresión génica viral y el anclaje cromosómico (E2), el ensamblaje del virus (E4), la inmortalización y la transformación E6 y E7 / HPV de alto riesgo solamente). Los últimos ORFs se activan sólo después de la diferenciación celular y codifican las proteínas de la cápside viral (L1 y L2). En la región reguladora aguas arriba no codificante (URR) se encuentran los promotores, potenciadores y otros elementos reguladores además del origen de replicación.

25

30

La vista actual divide el ciclo de vida del papilomavirus en tres etapas. En primer lugar, después de la entrada inicial en el núcleo celular en la capa basal del epitelio, donde existe el aparato necesario para la replicación, el genoma PV se amplifica, el ADN viral se sintetiza más rápido que el ADN cromosómico, aumenta el número de copias (hasta 35 50-300 copias por célula) (para revisión, ver Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus Replicación del ADN - desde la iniciación a la inestabilidad genómica Virology 2009 Feb 20; 384 (2): 360-8). La segunda etapa representa la replicación estable del ADN del VPH en fase S sincronizada con la replicación cromosómica y el mantenimiento del ADN viral como episomas nucleares multicopia extracromosómicos como resultado de la segregación / división del genoma viral en las células hijas. En esta etapa sólo se expresan genes tempranos y no se produce ni la síntesis de las proteínas de cápside L1 y L2 ni el montaje de virión.

35

40

Productos de genes tempranos proporcionan proteínas transformadoras que aseguran la expansión clonal de las células infectadas. Si las células infectadas se separan de la membrana basal y alcanzan las capas superiores de la piel o de la mucosa, dejan de dividirse y comienzan la diferenciación (queratinización). Se desencadena el inicio de la tercera etapa, la replicación del ADN viral vegetativo durante el cual se inicia de nuevo la amplificación del ADN viral, y luego b) se sintetizan las proteínas tardías y se ensamblan las partículas virales (véase Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus Replicación del ADN - de la iniciación a la inestabilidad genómica Virology, 2009 Feb 20, 384 (2): 360-8).

45

50

El modelado de estas etapas de replicación en células ha sido problemático en el caso de papilomavirus humanos. La mayoría de las células de cultivo de tejidos no soportan ningún modo de replicación genómica del VPH. Los intentos de obtener la replicación del ADN genómico viral procedente de los plásmidos transfectados de tipos de papilomavirus beta ha fracasado completamente en cualquier línea de células de queratinocitos o queratinocitos primarios. Además, ha sido difícil generar reproductivamente líneas celulares humanas que portan genomas de replicación de HPV estables, especialmente los de tipo "bajo riesgo" -HPV. La replicación estable de episomas de HPV se ha logrado sólo por un puñado de laboratorios. Se ha demostrado que el estado episomal sólo se permite en presencia de alimentadores o en condiciones de cultivo en balsa. W12, una línea celular de HPV-16 de uso frecuente, se ha originado a partir de una muestra de paciente, pero mientras se cultivan células W12 en monocapa, se ha demostrado que los eventos de integración tienen lugar en lugar del mantenimiento del estado episomal del genoma viral.

55

60

Sin embargo, la replicación de plásmidos que contienen origen de replicación de HPV puede demostrarse en muchas líneas celulares diferentes de especies diferentes en el caso de que la producción de proteínas E1 y E2 se proporcione a partir de vectores de expresión heterólogos. El factor principal que restringe la replicación a ciertas células epiteliales es por lo tanto la disponibilidad de la expresión coordinada de factores de transcripción celular para la transcripción de los ARNm para las proteínas virales.

65

Las vacunas dirigidas a HPV-16 y HPV-18 o HPV-6b, HPV-11, HPV-16 y HPV-18 se han desarrollado y están cada vez más disponibles en muchos países. Debe considerarse como un gran logro en la lucha contra los cánceres cervicales. Sin embargo, no es suficiente, ya que las vacunas se dirigen, en el mejor de los casos, sólo a cuatro subtipos de cientos de papilomavirus, incluido el tipo de "alto riesgo" de papilomavirus de la piel mucosal o cutáneo. Además, se ha demostrado de manera convincente que el VPH-16 y el VPH-18 son virus prevalentes encontrados en los carcinomas cervicales en los países desarrollados. Según el análisis epidemiológico molecular de la propagación del virus en los países en desarrollo, como en las regiones subsaharianas de África, prevalecen otros aislados de virus como HPV-52 y HPV-35.

Existe una necesidad urgente de los fármacos de moléculas pequeñas, que pueden ser utilizados para bloquear eficazmente la replicación del genoma del virus del papiloma, disminuyendo así la carga viral por célula y evitando la generación de partículas virales y, por tanto, la propagación del virus. Sin embargo, este objetivo ha sido difícil de lograr debido a la falta de un sistema celular eficaz para el cribado de fármacos candidatos. Este sistema celular debe ser compatible con el formato de alto contenido y alto contenido de la selección de los fármacos candidatos y permitir la identificación de las sustancias activas en formato reproducible y rentable. Modelos de xenoinjertos de animales han sido descritos previamente por J. Duan, WO0040082 (Un modelo animal de xenoinjerto reproducible para alojar y propagar el virus del papiloma humano (HPV)), así como queratinocitos primarios son aplicados para alojar el genoma viral por Kreider et al. 1993 y 1998, (US5541058, Sistema de ensayo in vitro que favorece la eficacia de los agentes antipapilomas virales, US6200745, sistema de ensayo Vitro utilizando una línea celular humana para ensayar la eficacia de agentes virales antipapiloma). Sin embargo, estos métodos no permiten el cribado de alto rendimiento para los candidatos a fármacos, por lo que sería necesario un método más sencillo y más conveniente. Nuestro grupo ha descubierto previamente la capacidad de la línea celular de osteosarcoma humano U2OS para apoyar el cultivo in vitro de HPV (K. Salk, 2009 Estudios sobre los mecanismos de la replicación del ADN de alto y bajo riesgo de papilomavirus humano en diferentes líneas celulares. tesis / en estonio / Universidad de Tartu Press, obtenido de Internet: http://www.ebc.ee/kaitsmised/2009/magistritood_2009/Kristiina_Salk.pdf). Sin embargo, el mantenimiento del HPV episomal por sí mismo no es suficiente para un ensayo de cribado de alto rendimiento para identificar posibles inhibidores de la replicación del VPH.

La técnica anterior más cercana, un método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación de HPV, ha sido descrito por Clark P. R y otros (Clark PR, Roberts ML, Cowser LM "Un nuevo ensayo de detección de fármacos para la actividad antiviral específica del papilomavirus15 "Antiviral Research, Elsevier Science BV, vol. 37, n° 2, febrero de 1998). Se han descrito células SCC-4 que soportan la fase transitoria, y se ha informado que algunas líneas celulares mantienen 30-40 copias por célula y otras 1-2 copias por célula. Clark P. R. y col. No describe un sistema celular que sería capaz de soportar las tres fases de replicación del virus HPV.

Los componentes usados en un método para identificar un compuesto capaz de inhibir la replicación del HPV han sido descritos por Brown C. et al. (Brown C., Kowalczyk AM, Taylor ER, Morgan IM, Gaston K. "p53 reprime el tipo de virus del papiloma humano 16 replicación del ADN a través de la proteína viral E2 "Virology Journal, Biomed Central, Londres, GB vol. 5 no, enero de 2008). La línea celular descrita sólo soporta la replicación transitoria cuando se cotransfecta con un plásmido que expresa 2m1, y no soporta todas las fases de replicación del VPH.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del ADN de Papilomavirus Humano (HPV) en replicación amplificatoria inicial, mantenimiento estable o fase amplificación vegetativa, así como un kit para identificar los compuestos capaces de inhibir la replicación del ADN de HPV en la replicación amplificatoria inicial, el mantenimiento de la tabla o la fase de amplificación vegetativa.

La presente invención proporciona un método, en el que se inserta ADN genómico o subgenómico de HPV en una línea celular, en el que se soporta la replicación del ADN de HPV, y además se determina la influencia de un compuesto en la replicación del ADN de HPV. La línea celular U2OS de osteosarcoma humano se identificó como una línea de células huésped factible para soportar la replicación del ADN del VPH. Ahora, de acuerdo con la presente invención, se identificaron células U2OS como huésped adecuado para la propagación de los genomas f de los VPH específicos de tejido mucoso y cutáneo y para las construcciones relacionadas con el genoma del VPH. También hemos demostrado que la replicación amplificatoria del genoma del VPH, similar a la amplificación en la fase vegetativa del ciclo de vida viral, se produce cuando los clones de células U2OS de HPV positivo se mantienen en alta densidad durante periodos prolongados con medios regulares (4-12≤ días).

Por lo tanto, se proporciona un método, en el que la detección cuantitativa del ADN de HPV replicado o, más preferiblemente, la detección de un producto de un gen informador o un producto de reacción de una proteína codificada por un gen indicador, permite el cribado de factores que inhiben el VPH Replicación del ADN en todas las diferentes fases de replicación del ciclo de vida del VPH: a) la replicación amplificatoria inicial demostrada por el ensayo de replicación transitoria; b) la replicación estable del ADN del VPH, sincrónica con la replicación del ADN celular, demostrada por el análisis de subclones de bajo a alto contenido de HPV; y c) la replicación amplificatoria

que se parece a la fase vegetativa de la replicación del ADN viral. Este tipo de método puede ser ampliamente utilizado en la investigación farmacológica y el cribado de nuevos potenciales candidatos a fármacos para la prevención o terapia de infecciones por varios subtipos de VPH.

5 Se proporciona el método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del ADN de HPV en la replicación de amplificación inicial, el mantenimiento estable o la fase de amplificación vegetativa que comprende las siguientes etapas:

10 A. DNA de HPV con secuencia completa o parcial que permite las etapas de replicación transitorias, estables y vegetativas del ADN de HPV se introduce en una línea celular U2OS de osteosarcoma humano que permite la replicación transitoria, estable y vegetativa del ADN de HPV en estas células;

15 B. Se generan colecciones de bancos de células de subclones estables que portan ADN de HPV extracromosómico con diferentes números de copias por célula;

C. El subclón celular elegido (para el tipo de HPV o para las variaciones del número de copias) se cultiva como un cultivo monocapa disperso de células en división y / o el subclón celular elegido se cultiva como una monocapa de cultivo denso;

20 D. el compuesto bajo investigación se aplica al recipiente de cultivo con la monocapa del subclón elegido que lleva el ADN del VPH;

25 E. se evalúa la presencia o ausencia del efecto inhibitor del compuesto sobre el mantenimiento y / o la amplificación del ADN viral en las células;

F. si se observa el efecto inhibitor sobre la replicación del ADN del VPH de una cierta concentración de un compuesto, el compuesto se identifica como un candidato para los inhibidores de la replicación del ADN del VPH.

30 En la realización preferida, la invención proporciona un método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación latente de ADN de HPV, que comprende las siguientes etapas:

35 A. El plásmido con secuencia completa o parcial de ADN de HPV que lleva todas las secuencias cis y transfactores víricas que aseguran que todas las etapas de los ciclos de replicación vírica, que también pueden abarcar una secuencia de un gen indicador, se introducen en la línea celular de osteosarcoma humano U2OS usando métodos como, pero sin limitarse a, electroporación o métodos de transfección química conocidos en la técnica;

40 B. se aíslan los clones de líneas celulares U2OS que llevan plásmidos de HPV de replicación extracromosómica utilizando marcadores de selección que proporcionan resistencia a los antibióticos como G418 o puromicina u otros marcadores de selección conocidos en la técnica;

45 C. los clones de células identificados que llevan diferentes copias de HPV por célula se crecen, se determina la estabilidad y se generan bancos de estos clones de células;

D. las células del subclón seleccionadas para la identificación de inhibidores de la replicación latente de HPV se siembran a baja densidad en placas de 96 ó 384 pocillos, y las células se cultivan durante un período corto manteniendo la replicación del ADN de HPV en la fase latente;

50 E. posteriormente, el compuesto bajo investigación se aplica al cultivo monocapa de clones celulares antes de confluencia para identificar inhibidores de replicación latente;

55 F. el aumento o la falta de aumento del número de copias de HPV en las células se determina mediante medición cuantitativa o semicuantitativa directa de la cantidad de ADN viral o por medición de las cantidades de los productos de los genes informadores insertados en el plásmido HPV;

60 G. el compuesto se identifica como un candidato para un inhibidor de la replicación latente del ADN de HPV, si se observa el efecto inhibitor sobre la replicación estable del ADN de HPV de una cierta concentración del compuesto.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación amplificada vegetativa del ADN de VPH inducida, que comprende las siguientes etapas:

65 A. con una secuencia completa o parcial de ADN de HPV que lleva todas las secuencias cis y transcritas que aseguran que todos los pasos de los ciclos de replicación del ADN viral, que también pueden abarcar una secuencia de un gen indicador, se introducen en la línea celular de osteosarcoma

humano U2OS usando métodos tales como, pero no limitados a, electroporación o métodos de transformación química conocidos en la técnica;

5 B. se aíslan los clones de líneas celulares U2OS que llevan plásmidos de HPV de replicación extracromosómica utilizando marcadores de selección que proporcionan resistencia a los antibióticos como G418 o puromicina u otros marcadores de selección conocidos en la técnica;

10 C. se identifican los clones de células identificadas que llevan copias de HPV diferentes por célula, se determina su estabilidad, se miden las magnitudes de amplificación y se generan bancos de células de estos clones de células;

15 D. las células del subclón seleccionadas para la identificación de la replicación amplificación vegetativa se sembraron en placas de 96 ó 384 pocillos y se dejaron en confluencia por alimentaciones adicionales durante al menos 4 a 12 \leq días para el lanzamiento de la fase de replicación amplificación exponencial con número de copias aumentado del ADN episomal replicado por célula;

20 E. Posteriormente, el compuesto bajo investigación, el potencial candidato a fármaco, se añade al medio de cultivo del recipiente de cultivo de las monocapas de clones de células U2OS en confluencia para identificar inhibidores de replicación amplificadora vegetativa;

F. el aumento o la falta de aumento del número de copias de HPV en las células se determina mediante medición cuantitativa o semicuantitativa directa de la cantidad de ADN viral o por medición de la cantidad de los productos de los genes informadores insertados en el plásmido de HPV;

25 G. el compuesto se identifica como un candidato para un inhibidor de replicación amplificativa vegetativa de ADN de HPV, si se observa efecto inhibidor sobre la replicación del ADN de HPV de una cierta concentración del compuesto.

30 El efecto inhibidor puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que permita la detección cuantitativa del ADN extracromosómico (plásmido). Sin embargo, los métodos más preferibles comprenden, pero no se limitan a, insertar secuencias de ácido nucleico, que codifican un gen reportero, a la construcción de replicación episomal. Estos genes indicadores pueden codificar cualquier proteína detectable y medible directamente conocida en la técnica, o proteínas que catalizan una reacción, cuyo producto puede medirse cuantitativa o semicuantitativamente, por ejemplo, mediante observación visual con un microscopio. El producto medible puede permanecer dentro de la célula o puede ser excretado en el medio. Ejemplos de tales genes informadores comprenden, pero no se limitan a, dGFP, luciferasa, fosfatasa alcalina secretada, luciferasa de Gaussia, gen de fusión dGFP - Luciferasa. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico del gen informador se inserta en la región del genoma de HPV, que codifica para los genes L. Lo más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico del gen indicador sustituye a los genes L1 y L2 del genoma de HPV,

45 Los subclones proporcionados para la selección a partir de los bancos de células generados se seleccionan entre los que llevan la variedad de números de copias que van desde números de copias bajos a altos de plásmido de HPV por célula.

50 Los subtipos de HPV proporcionados en la presente invención comprenden, pero no se limitan a, HPV-18, HPV-16, HPV-6b, HPV-11, HPV-5 y HPV-8. Estos subtipos pertenecen a subgrupos mucosales de alto riesgo, bajo riesgo y tipo cutáneo de HPV, proporcionando así medios previamente no descritos para detectar sustancias capaces de inhibir la replicación del ADN de los VPH de bajo riesgo y de tipo cutáneo. La fase latente de la replicación del ADN de HPV proporcionada en la invención, modela el proceso de replicación del ADN viral que ocurre en las células que se dividen en la capa basal y suprabasal de la piel, infectadas por el VPH. La fase de replicación amplificativa vegetativa de la replicación de HPV proporcionada en la invención modela el proceso de replicación del ADN viral que ocurre en la naturaleza en células no divisorias en las capas superiores de la piel.

55 Además, la presente invención proporciona un kit para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del ADN de HPV en la replicación inicial, el mantenimiento estable y la fase de amplificación vegetativa. Este kit comprende al menos: la línea celular de osteosarcoma humano U2OS, que permite la replicación inicial, el mantenimiento estable y las fases de amplificación vegetativa del ciclo de replicación del ADN del VPH; una construcción extracromosómicamente mantenible con secuencias completas o parciales de ADN de HPV con genes L1 y L2 sustituidos con los genes indicadores para su introducción en la línea celular U2OS; un compuesto o una biblioteca de compuestos que se deben examinar para determinar la actividad anti - VPH; y un medio para la evaluación cuantitativa de la actividad replicacional, transcripcional o traslacional del ADN del VPH en las células. La construcción extracromosómicamente mantenible es según SEQ ID NO: 3.

Por lo tanto, se proporcionan datos experimentales para ilustrar la capacidad de la línea celular U2OS para soportar la replicación del ADN del HPV en el establecimiento, en la fase de mantenimiento latente, así como los fenómenos inesperados de la inducción de la amplificación exponencial del ADN viral imitando la fase vegetativa de la infección.

5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 - Fig. 4. Ensayos transitorios de replicación de ADN de tipo mucoso de alto riesgo, bajo riesgo y cutáneo del VPH subgrupos.

10 Las células U2OS fueron transfectadas con el genoma del HPV-16 (Figura 1), con los genomas HPV-6b, HPV-11, HPV-18 (Figura 2);

Se realizaron genomas de HPV-5 y HPV-8 (Fig. 3 y Fig. 4) y ensayo de replicación a corto plazo.

15 Antes de la transfección, los DNAs de HPV se escindieron de la estructura principal del vector: genoma de HPV-18 del vector pBR322 con EcoRI; HPV - 6b de pBR322 con BamHI; HPV-16 y HPV-11 genomas de pUC19 con BamHI; ADN del VPH-8 del vector pUC9 con BamHI; HPV - 5 de pBR322 con SacI. Los fragmentos lineales de HPV (aproximadamente 8 kb) se religaron a bajas concentraciones de ADN (5 mg / ml) durante 16 horas a 4°C.

20 Fig. 1. Detección de la respuesta de dosis del tipo de mucosa introducido del plásmido reportero HR-HPV16: Se introdujeron 1, 2 y 5 mg de ADN de plásmido circular religado del genoma de HPV-16 en células U2OS. El ADN de bajo peso molecular se extrajo 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección por el método de lisis de Hirt y el análisis de restricción se realizó usando la enzima linealizadora BamHI y DpnI sensible a la metilación bacteriana. Para la hibridación Southern blot se utilizó la sonda específica de HPV-16 de longitud completa. La intensidad de la banda lineal de 8 kb aumentó en el tiempo (indicado por la flecha), que se considera como la indicación de la replicación del genoma viral en estas células. Las señales de replicación aumentaron también dependiendo de la concentración.

30 Fig. 2. Establecimiento de la replicación del ADN del LR-HPV-6b, LR-HPV-11 y HR-HPV-18. Se introdujeron ADN plasmídicos circulares de los genomas HPV-6b, HPV-11 y HPV-18 (5 mg) en células U2OS. Las muestras de lisis de Hirt se digirieron con enzima linealizadora apropiada (véase marcadores) adicionalmente a DpnI, y las señales de ADN de HPV replicadas se detectaron mediante transferencia de Southern con sondas específicas de genoma de HPV radiomarcadas. Las señales de replicación resistentes a DpnI lineal de aproximadamente 8 kb, que están aumentando en el tiempo, se muestran en el caso de los tres tipos de virus de papilomavirus investigados.

35 Fig. 3. Establecimiento de la replicación del ADN del tipo cutáneo del genoma del VPH-5. El ADN del plásmido circular religado del genoma del HPV-5 se tituló (2, 5, 10 mg) en células U2OS y se cargaron muestras de lisis de Hirt (ADN episomal, tratadas con SacI / DpnI) 24, 48, 72, 96 horas después de la transfección por transferencia Southern con sonda genómica HPV-5 de longitud completa (flecha).

40 Fig. 4. Establecimiento de la replicación del ADN del tipo cutáneo del genoma del VPH-8. El ADN del plásmido circular religado del genoma de HPV-8 se tituló (2, 5, 10 mg) en células U2OS. Las bandas lineales de 8 kb del ADN episomal replicado (muestras de lisis de Hirt tratadas con BamHI / DpnI) del genoma del HPV-8, que aumentan en el tiempo y dependen de la concentración, se indican mediante una flecha.

45 Fig. 5 - Fig. 12. Mantenimiento estable de genomas de HPV en células U2OS.

50 Fig. 5. Replicación estable del ADN de los plásmidos HPV de alto y bajo riesgo en células U2OS. 5 mg de plásmido circular religado de HPV-6b, -11, -16, -18 junto con 5 mg de ADN portador AraD y con 2 mg de plásmido pNeo-EGFP linealizado Eco0109I se introdujeron en células U2OS. Las células se sometieron a una selección de G418 48 horas después de la transfección y se cultivaron con selección aproximadamente tres semanas después de la transfección. Se analizaron muestras de ADN extracromosómico de bajo peso molecular procedentes de depósitos de células parentales, extraídos por el método de Hirt. Las muestras se digirieron con enzima linealizante y se detectaron las señales de HPV mediante transferencia de Southern con sondas mixtas de HPV radiomarcadas. También se muestran muestras de ADN, que se cultivaron 3 semanas sin la selección de G418 después de la transfección.

Fig. 6 - Fig. 12. Análisis de transferencia Southern de subclones de células individuales de diferentes subtipos de HPV en la línea celular U2OS.

60 Se introdujeron 5 mg de plásmido circundado de HPV circular junto con 5 mg de ADN portador (AraD) y 2 mg de plásmido pNeo-EGFP linealizado o pBabeNeo en células U2OS. A partir de 48 horas después de la transfección se realizó la selección de G418 durante aproximadamente tres semanas. Se transfirieron las diluciones de 5000, 10.000 y 50.000 células por plato de 100 mm de los depósitos de células parentales y se aislaron, crecieron y analizaron las colonias de células individuales. El ADN genómico total se aisló por método estándar. Se cargaron 10 mg de la versión linealizada del ADN celular total en un gel y se analizaron mediante transferencia de Southern con una sonda específica del genoma específico del HPV radiomarcada.

65

El número de copias se estimó mediante curvas estándar de los carriles marcadores. Se generaron bancos de células de estos clones de células.

5 Fig. 6. Serie de líneas de células U2OS positivas HR-HPV18 que contienen plásmidos estables de HPV-18 a diferentes niveles.

Se analizaron 10 mg de ADN celular total linealizado con EcoRI mediante transferencia de Southern con sonda específica del genoma HPV-18 de longitud completa marcada radioactivamente. Los números de clones se indican en la figura de arriba de la serie y los números de copias calculados se muestran por carriles. Los clones de células identificadas llevan un número diferente de copias de HPV-18 por célula.

10 Fig. 7. Análisis de poblaciones de células clonales positivas HR - HPV16. Se analizaron 10 mg de ADN celular total linealizado con BamHI mediante transferencia Southern con sonda específica del genoma HPV-16 de longitud completa radiomarcada. Los números de copias calculadas y los números de clones se indican en la figura. Los clones de células identificadas llevan diferentes números de copias de HPV-16 por célula, variando desde un número de copias bajo a alto.

15 Fig. 8. Serie de líneas de células U2OS positivas LR-HPV11 que contienen plásmidos estables de HPV-11 a diferentes niveles de contenido. Se analizaron 10 mg de ADN celular total linealizado con BamHI mediante transferencia de Southern con sonda específica de genoma específico de HPV-11 de longitud completa radiomarcada. Los números de copias calculadas y los números de clones se indican en la figura. Los clones de células identificadas llevan un número diferente de copias de HPV-11 por célula.

20 Fig. 9. Serie de líneas de células U2OS positivas LR-HPV6b que contienen plásmidos estables de HPV-6b a diferentes niveles. Se analizaron 10 mg de ADN celular total linealizado con BamHI mediante transferencia Southern con sonda específica del genoma de HPV-6b de longitud completa radiomarcada. Los números de copias calculadas y los números de clones se indican en la figura. Los clones de células identificadas llevan un número diferente de copias de HPV-6b por célula.

25 Fig. 10. Líneas celulares U2OS humanas con un número de copias de plásmidos HPV-5 estables a bajo o alto. Se analizaron 10 mg de ADN celular total linealizado con SacI mediante transferencia de Southern con sonda específica de genoma específico de HPV-5 de longitud completa radiomarcada. Los números de copias calculadas y los números de clones se indican en la figura. Los clones de células identificadas llevan un número diferente de copias de HPV-5 de tipo cutáneo por célula.

30 Fig. 11. Líneas celulares U2OS humanas que transportan un número bajo o alto de copias de plásmidos HPV-8 estables por célula. El ADN celular total linealizado con BamHI se analizó mediante transferencia de Southern con sonda específica del genoma de HPV-8 de longitud completa radiomarcada. Los números de copias calculadas y los números de clones se indican en la figura. Los clones de células identificadas llevan diferentes números de tipo cutáneo de copias de HPV-8 por célula.

35 Fig. 12. Mantenimiento del genoma del HPV-18 en la línea celular U2OS. El subclon HPV-18 # 1.13 se cultivó en condiciones de cultivo de células monocapa normales durante las siguientes 11 semanas después de la primera detección de la positividad de la señal de HPV-18. La estabilidad del ADN extracromosómico de HPV-18 durante el curso del tiempo se determinó mediante análisis de transferencia Southern de muestras de ADN de bajo peso molecular linealizadas de lisados de Hirt extraídos de un plato de cultivo de 100 mm. En paralelo se cargaron 2 mg de ADN celular total linealizado y se comparó la señal de mantenimiento de HPV-18 durante el mismo curso de tiempo.

40 Fig. 13 - Fig. 18. La inducción de la amplificación del ADN demostrada por la línea celular positiva de HPV-18 U18 # 1.13.

Se tomó una muestra de la línea celular U18 # 1.13 del banco de células, se cultivaron células como monocapas normales y se sembraron 106 células en cada una de las seis placas de cultivo de 100 mm para cultivo adicional. Se añadieron 2 ml de medio de cultivo fresco (IMDM) cada dos días, pero no se realizó ninguna división de las células. Los puntos de tiempo para el análisis se tomaron al día siguiente después de añadir el medio durante un período de crecimiento de 12 días con un intervalo de 2 días. Se presentan series de crecimiento dependientes del tiempo para obtener cultivos celulares densos.

45 Fig. 13. Las curvas de crecimiento de U2OS no transfectado y la línea celular positiva U18 # 1.13 del HPV-18. Se presentan series de crecimiento dependientes del tiempo para obtener cultivos celulares densos. Las células se contaron con el contador de células Invitrogen Countess antes del análisis.

50 Fig. 14. Cantidad de ADN total resumido en series cronológicas. El ADN total se aisló mediante procedimientos estándar y las concentraciones de ADN se midieron mediante el trofotómetro NanoDrop spec ND-1000.

55 Fig. 15. Análisis de transferencia Southern de la cantidad constante de ADN celular total en diferentes puntos temporales. Se digirieron cantidades iguales (mostradas 10 mg) de ADN celular total con enzima linealizadora

EcoRI, y se detectó la amplificación del genoma de HPV-18 con sonda específica del genoma HPV-18 radiomarcada. Se demuestra la inducción de la amplificación del ADN.

Fig. 16. Calculó los números de copias del HPV-18 en diferentes puntos temporales.

5 Las intensidades de la señal de replicación de la línea celular U18 # 1.13 se midieron usando el software Phosphor-Imager y ImageQuant. El número de copias del genoma del HPV-18 se estimó mediante curvas estándar de carriles marcadores. Se resumen tres series diferentes.

Fig. 17. Análisis por RT-PCR de los niveles de mRNA de la línea celular U18 # 1.13 en diferentes puntos temporales.

10 mRNA niveles de viral las proteínas se investigaron en diferentes puntos de tiempo durante la inducción de la amplificación. El ARN total se extrajo con el reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se trató con DNasa I (Fermentas) seguido de inactivación por calor de la enzima. El ADNc se sintetizó con el kit de síntesis de cDNA de First Strand (Fermentas) usando 1 mg de ARN total como molde y cebadores de oligo-dT en 20 ml de volumen de reacción. El ADNc se diluyó en 160 ml y se utilizaron 2,5 ml de la dilución en una única reacción de PCR junto con cebadores directos e inversos de 300 nM y 2 ml de mezcla maestra comercial 5 x HOT FIREPOL® EvaGreen® qPCR Mix (Solis Biodyne) en 10 ml del volumen de reacción total. La amplificación se realizó en el sistema de PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems) y se analizó utilizando el método Ct (Δ Ct) comparativo, comparando las señales específicas de transcritos de HPV con la señal de β -actina del gen de referencia. Las señales se normalizaron hasta el punto cero. RT-PCR análisis muestra upregulation de los niveles de mRNA que codifican las proteínas virales E1, E2, E6, E7, L1.

Fig. 18. El análisis de gel bidimensional neutro / neutro (N / N 2D) para determinar la estructura de los intermedios de replicación del ADN (RIs).

25 El ADN total de células U18 # 1.13 cultivadas como cultivo monocapa denso se analizó por digestión con enzima HindIII como no cortante para ADN de HPV-18 y se separó en gel 2D. La muestra de 10 mg de ADN total se cargó en un gel de agarosa al 0,4% en tampón TBE 0,5x. La primera dimensión se sometió a electroforesis a 10 V durante 48 horas. El carril de interés se cortó de la primera dimensión y se giró 90°. Se aplicó gel de agarosa al 1% en TBE 0,5x en la segunda dimensión con EtBr (0,33 mg / ml) a 150 V durante 6 h. El DNA se transfirió del gel a un filtro de nylon, y se probó con sonda específica del genoma HPV-18. Los marcadores de tamaño de los ADN superenrollados se muestran en ambas direcciones. La presencia de un plásmido circular de 8 kb se muestra mediante una flecha; también se detecta la generación de multímeros de plásmidos de alto peso molecular.

Fig. 19 - Fig. 20. Aumento del número de copias de HPV-18 en células U2OS detectadas por hibridación in situ de fluorescencia.

35 106 células de la línea celular U18 # 1.13 se sembraron en un plato de cultivo de 100 mm, y se cultivaron durante 2 semanas en cultivo celular, añadiendo 2 ml de medio de cultivo fresco cada dos días, pero no se realizó ninguna división de las células. Las muestras se recogieron el primer y el decimocuarto día después de la siembra y se analizaron por hibridación fluorescente in situ (FISH) (Invitrogen Corporation, TSA™ Kit nº 22). Las sondas de hibridación se generaron mediante traducción de muescas, utilizando el genoma de HPV-18 como plantilla y biotina-16-dUTP como marcador. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI y se montaron en PBS con 50% glicerol.

Fig. 19. U18 # 1.13 células con señal de HPV-18 en el primer día después de la siembra.

Fig. 20. U18 # 1.13 células con señal de HPV-18 2 semanas después de la siembra. La señal positiva de HPV-18 ha aumentado en el cultivo de células densas debido a la amplificación de genomas virales.

Fig. 21. El plásmido pUCHPV-18E, (SEQ ID NO 1.)

50 La mayor parte de la región tardía (ORL L1 y L2) del genoma de HPV-18 se eliminó por escisión con Apal y Bpil. La región eliminada se reemplazó por el fragmento que contenía las secuencias necesarias para la propagación del plásmido en células de E. coli (origen de replicación de pMB1 y marcaje de resistencia a beta-lactamasa marcado con blas) amplificado a partir del vector de clonación pUC18. Las secuencias bacterianas insertadas pueden eliminarse mediante digestión con HindIII.

Fig. 22. El plásmido pUCHPV-18E-Gluc (SEQ ID NO 2).

55 Se insertaron en el pUCHPV-18E casete de expresión que incluye elemento 5' intrón sintético, secuencia codificada optimizada codificando el gen marcador de luciferasa de Gaussia, así como señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, de manera que la región temprana del genoma del HPV-18 permaneció intacta. Las secuencias bacterianas pueden eliminarse mediante digestión con HindIII.

Figura 23. El plásmido pUCHPV-18E-TKGluc (SEQ ID NO 3). El plásmido se hizo a partir del pUCHPV-18E-Gluc mediante la inserción de la región promotora de la timidina quinasa (TK) derivada del virus Herpes Simplex 1 (HSV1) frente a

el casete de expresión Int-Gluc-bgh. Las secuencias bacterianas pueden eliminarse mediante digestión con HindIII.

65 Descripción de las realizaciones preferentes

Ejemplo 1

Replicación del AND del VPH transiente en células U2OS

5 Los papilomavirus humanos muestran un tropismo fuerte para las células epiteliales. Hemos descubierto que la línea celular de osteosarcoma humano U2OS, que exhibe morfología adherente epitelial, aunque derivada de un osteosarcoma moderadamente diferenciado, soportó muy eficazmente la replicación del ADN viral dependiente de proteínas E1 y E2 de HPV, cuando los vectores de expresión para proteínas de replicación viral se usaron junto con plásmidos reporteros que contienen origen viral. Las células U2OS codifican pRb de tipo salvaje y p53.

10 A continuación se investigó si los factores trans víricos (E1 y E2) podrían actuar en sus configuraciones nativas que soportan la replicación de los genomas virales en cultivos monocapa U2OS. Se incluyeron cuatro tipos diferentes de papilomavirus cutáneos, dos de ellos de alto riesgo (HR / HPV-18 y HR / HPV-16) y dos de bajo riesgo (LR / HPV-11 y LR / HPV-6b) según su pronóstico para el desarrollo del cáncer. Además, se incluyeron dos subtipos, el HPV-5 y el HPV-8 como infección de la piel β-papilomavirus. Las células U2OS fueron transfectadas con el genoma de HPV-16 (Figura 1), con HPV-6b, HPV-11, HPV-18 genomas (Fig. 2); con genomas de HPV-5 y HPV-8 (Fig. 3 y Fig. 4, respectivamente) junto con el ADN portador (5 mg de plásmido AraD) y ensayo de replicación a corto plazo. Antes de la transfección, los DNAs de HPV se escindieron de la estructura principal del vector: genoma de HPV-18 del vector pBR322 con EcoRI; HPV - 6b de pBR322 con BamHI; HPV-16 y HPV-11 genomas de pUC19 con BamHI; ADN del VPH-8 del vector pUC9 con BamHI; HPV - 5 de pBR322 con SacI. Los fragmentos lineales de HPV (aproximadamente 8 kb) se purificaron en gel y se religaron a bajas concentraciones de ADN en la mezcla de ligación (30 mg / ml) durante 16 horas a 4°C.

25 Como se ve en la Fig. 1, la introducción de cantidades crecientes (1, 2 y 5 mg) del plásmido HPV-16 en las células U2OS eleva la señal de replicación del ADN viral con aumento de tiempo (Fig. 1, carriles 1 -4, 5-8, 9-12) y dependiendo de la concentración (Fig. 1, bloques de carriles 1-4; 5-8; 9-12). Se ha obtenido el mismo patrón de replicación transitorio a corto plazo en el caso de otros cinco tipos de HPV estudiados. Como se ve en las figuras, la intensidad de las bandas lineales de 8 kb en las muestras tratadas con DpnI (indicadas por flechas) aumenta en el tiempo, lo que se considera como indicación de replicación del genoma viral en estas células (Fig. 2, carriles 1 -4 en el caso de 5 mg de ADN de plásmido de HPV-6b insertado, carriles 7-10 con HPV-11 y carriles 11-14 con ADN de HPV-18 y Fig. 3 e ID para HPV-5 y HPV-8, respectivamente).

35 Todos los plásmidos de HPV transfectados pueden iniciar la replicación del ADN viral en la línea celular U2OS a niveles bastante comparables en ensayos a corto plazo como se ha observado en experimentos independientes.

40 El hecho de que los diversos grupos de genomas circulares de HPV de HPV-6b, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-5 y HPV-8, respectivamente, son capaces de establecer la replicación del ADN viral en células U2OS, sugiere que los elementos reguladores virales son adecuadamente funcionales para apoyar la replicación del ADN de estos tipos de virus y que los factores de transcripción y replicación viral y celular se expresan adecuadamente. Por lo tanto, un compuesto capaz de inhibir la primera etapa amplificatoria de la replicación del ADN viral en el cultivo de células U2OS puede considerarse como un candidato potencial para el tratamiento / prevención del VPH de la infección por VPH. La observación es válida al menos para los VPH de la mucosa de alto riesgo y de bajo riesgo, así como para los VPH cutáneos.

45 Ejemplo 2

Reacción estable de HPV en U2OS MONOLAYER CULTURES Establecimiento de mantenimiento persistente del VPH en la línea celular U2OS

50 Una señal de replicación de ADN genómico de HPV muy fuerte en células U2OS en ensayos transitorios sugirió una evaluación adicional de la capacidad de los plásmidos HR y LR-HPV para la replicación episomal estable. Para este propósito, se co-transfectaron en células U2OS 5 mg de plásmido circular HPV-6b, o HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-5, HPV-8 junto con 5 mg de ADN portador AraD y 2 mg de Eco0109I- linealizado de pNeo-EGFP o plásmido pBabeNeo linealizado con EcoRI, que codifica marcador de resistencia a antibióticos, lo que permitiría la selección para las células transfectadas. 48 horas después de la transfección G418 selección se realizó. Después de dos o tres semanas de cultivo con la selección de G418, los extractos de Hirt de bajo peso molecular (LMW) de la población de células enteras (DNA "pool") se analizaron mediante transferencia de Southern con sondas radiomarcadas contra los tipos apropiados de HPV. El análisis muestra que todas las muestras ensayadas contenían genomas de HPV a niveles bastante comparables, lo que indica que las células seleccionadas contenían el replicón de HPV (Figura 5). Los genomas del VPH transfectados fueron muy eficientemente mantenidos incluso en serie sin selección (Fig. 1).

65 Para la detección de líneas celulares humanas clonadas que llevan episomas de HPV de replicación extracromosómica, se transfirieron diluciones de 5000, 10.000 y 50.000 células por plato de 100 mm de población celular seleccionada y se recogieron, expandieron y cultivaron las colonias de células individuales bajo la selección G418. Se extrajo el ADN genómico total de estos clones y se realizó el análisis de transferencia de Southern con 10

mg de Linearizada con EcoRI (Figura 6), linealizada con BamHI (Fig. 7, 8, 9, 11) o sacualizada con SacI (Figura 10) de ADN celular total usando sondas específicas de subtipos de HPV de longitud completa, marcadas radiactivamente. Se detectaron conjuntos de subclones de células individuales para cada tipo de HPV diferente en la línea celular U2OS (figura 6 - figura 11) y se pusieron en el banco de células. En la Fig. 6 y la Fig. 7 se muestran ejemplos positivos de subclones de tipo de alto riesgo de HPV-18 y HPV-16, que llevan diferentes copias de los genomas de HPV por línea celular. También se aislaron los clones de células U2OS que portaban el tipo de HPV-11 y HPV-6 de bajo riesgo (mostrados en la Fig. 8 y Fig. 9), así como los subclones para los tipos HPV-5 y HPV-8 de papilomavirus β en la figura 10 y la figura 11). El número de copias de ADN viral en diferentes líneas celulares variaba de muy baja a muy alta copia por clon como se indica mediante transferencia de Southern. El número de copias de los genomas virales se estimó utilizando cantidades conocidas de los plásmidos de HPV en el mismo gel. Se realizó un análisis del estado episomal del ADN más FISH.

Seguimiento a largo plazo de subclones positivos para HPV mediante análisis de transferencia de Southern

Para los subclones positivos aislados de HPV, el seguimiento a largo plazo se realizó mediante análisis de transferencia de Southern para determinar la estabilidad de la replicación de mantenimiento episomal que continúa en pasajes posteriores. La mayoría de las líneas celulares ensayadas eran estables en cultivos monocapa con condiciones de cultivo regulares en cultivos monocapa durante al menos dos meses de inspección (ejemplo con el subclon # 1.13 del HPV-18 en la figura 12).

Existía una cierta pérdida de plásmidos en el tipo de bajo riesgo de inspección de HPV-11 y HPV-6b, si el paso continuo de las líneas celulares tuvo lugar.

El subclon HPV-18 # 1.13 se cultivó en condiciones de cultivo de células monocapa normales durante 11 semanas a partir de la detección de una señal positiva de HPV-18. La estabilidad del ADN extracromosómico de HPV-18 a lo largo del curso del tiempo se determinó mediante análisis de transferencia Southern de muestras de ADN de bajo peso molecular linealizadas (EcoRI) de lisados de Hirt, extraídas cada vez de un plato de cultivo de 100 mm. En series paralelas se cargó una cantidad igual (2 mg) de ADN celular linealizado (ADN total) y se comparó durante el mismo curso de tiempo. Se utilizó la sonda específica del genoma HPV-18 de longitud completa. El hecho de que el diverso grupo de genomas circulares de HPV de HPV-6b, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-5 y HPV-8, respectivamente, son capaces de mantener la replicación del ADN viral en células U2OS en cultivos monocapa sugiere además que los elementos reguladores virales son adecuadamente funcionales para soportar al menos un paso de replicación de ADN viral estable o latente de estos tipos de virus y que los factores de transcripción y replicación viral y celular se expresan adecuadamente. De este modo, un compuesto capaz de inhibir la etapa latente de replicación del ADN en el cultivo de células U2OS puede considerarse un candidato potencial para el tratamiento / prevención del VPH en la fase latente de la infección por VPH. La observación es válida al menos para los VPH de la mucosa de alto riesgo y de bajo riesgo, así como para los VPH cutáneos. El establecimiento de subclones con el número de copias del plásmido HPV que varía de bajo a alto confirma la utilidad de las herramientas creadas, deseadas en la búsqueda de fármacos anti-VPH.

Ejemplo 3

Amplificación tardía de los genómos del VPH

Amplificación del genoma de una manera similar a la diferenciación dependiente de la amplificación viral

En la etapa productiva del ciclo de vida de la PV, la amplificación del genoma viral se produce en células diferenciadas dentro de la capa superior de la epidermis. Para estudiar la etapa productiva del ciclo de vida viral en el cultivo de tejidos, se ha intentado reproducir la arquitectura tridimensional del epitelio con cultivos organotípicos o en balsa, suspensión en metilcelulosa, células alimentadoras, mediante cultivo regulado y condiciones de crecimiento.

Se utilizó un método alternativo, sólo cultivos de células densas para imitar la diferenciación dependiente de la amplificación viral. Para este fin, se dividieron en varios platos (por ejemplo 6) un número igual de células (por ejemplo 1×10^6 células por plato de cultivo de 10 cm) de clon de célula HPV-positiva apropiada y se mantuvieron como monocapas confluentes regulares crecidas hasta altas densidades. Se recogieron las muestras de DNA total o de bajo peso molecular (Hirt) al día 2, 4, 6, 8, 10, 12, (...), se aislaron y se analizaron.

Utilizando la línea de células positivas HPV-18 H18 # 1.13 como ejemplo, la inducción de la amplificación de ADN de HPV se muestra en la figura 13-18. Se ensayó el mismo tipo de amplificación para todos los tipos de HPV bajo investigación. Los ejemplos de curvas de crecimiento celular se dan en la figura 13 y las cantidades crecientes de ADN total extraído en serie en la figura 14. En la figura 15, cantidades constantes, iguales de ADN total de la serie se cargaron en el gel y se analizaron por Southern blot usando EcoRI como una única enzima de corte para HPV-18 y sonda específica de virus. El ADN del VPH se amplifica en condiciones de cultivo denso (figura 15), mostrada en la figura 16 con los datos cuantitativos. Se realizaron varios experimentos repetidos. Análisis por RT-PCR muestra una regulación positiva de la síntesis de los niveles de ARN virales de proteína E1, E2, E6, E7, L1 (Figura 17). El patrón

de hibridación de electroforesis en gel bidimensional neutro / neutro (2D) indica la presencia de formas monoméricas y multiméricas de plásmidos de HPV (Figura 18). Las diferencias en la forma de los intermedios de replicación del ADN en el análisis de restricción 2D en dos etapas (primero y 12. día después de la siembra) serían la indicación de que se ha cambiado el modo de replicación.

Para caracterizar la aparición de la formación de episomas de ADN de HPV intracelular complementaria al análisis de transferencia de Southern, se realizó la hibridación in situ de fluorescencia de interfase y metafase (FISH) para los subclones estudiados (Invitrogen Corporation, TSA™ Kit nº 22). Ejemplos de FISH de interfase para el subclon # 1.13 de HPV-18 se muestran en la Fig. 19 - Fig. 20. Las células U18 # 1.13 muestran la señal de HPV-18 el primer día después de la siembra (Figura 19). Dos semanas después de la siembra, la señal positiva de HPV-18 en células U18 # 1.13 ha aumentado debido a la amplificación de genomas virales (Figura 20).

Como se observa a partir de estos ejemplos, el plásmido de HPV atraviesa una etapa de replicación amplificadora en la fase confluyente U2OS, llevando su número de copias hasta decenas de miles por célula y, por lo tanto, es aplicable para un experto en la técnica usarlo en un sistema de alto rendimiento para el cribado de agentes que exhiben propiedades anti-HPV. Por lo tanto, un compuesto capaz de inhibir la replicación del ADN en la fase de cultivo de células U2OS puede considerarse un candidato potencial para el tratamiento / prevención del VPH en la fase amplificatoria de la infección por VPH. La observación es válida al menos para los VPH de la mucosa de alto riesgo y de bajo riesgo, así como para los VPH cutáneos.

Ejemplo 4

El plásmido pUCHPV-18E, (SEQ ID NO 1.) La mayor parte de la región tardía (L1 y L2 ORFs) del genoma de HPV-18 se eliminó por escisión con Apal y Bpil. La región eliminada se reemplazó por el fragmento que contenía las secuencias necesarias para la propagación del plásmido en células de E. coli (origen de replicación de pMB1 y gen marcador de resistencia a beta-lactamasa (bla) amplificado a partir del vector de clonación pUC18). Las secuencias bacterianas insertadas se eliminaron mediante digestión con HindIII. Como resultado, se obtuvo una construcción de plásmido con la región temprana de HPV-18. El mapa del plásmido se presenta en la figura 21.

Ejemplo 5

El plásmido pUCHPV-18E-Gluc (SEQ ID NO 2). Se insertaron en el pUCHPV-18E casete de expresión que incluye elemento 5' intrón sintético, secuencia codificada optimizada codificando el gen marcador de luciferasa de Gaussia, así como señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, de manera que la región temprana del genoma del HPV-18 permaneció intacta. Las secuencias bacterianas se eliminaron mediante digestión con HindIII. Como resultado, se construyó un plásmido con una región temprana de HPV-18, que porta un gen informador que permite la detección cuantitativa o semicuantitativa de ADN de HPV-18 mucosal extracromosómico de alto riesgo. El mapa del plásmido se presenta en la Fig. 22.

Ejemplo 6

El plásmido pUCHPV-18E-TKGluc (SEQ ID NO: 3). El plásmido se hizo a partir de pUCHPV-18E-Gluc mediante la inserción de la región promotora de timidina quinasa (TK) derivada de virus 1 de Herpes Simplex (HSV1) delante del casete de expresión de Int-Glucbgh. Las secuencias bacterianas se eliminaron mediante digestión con HindIII. Como resultado, se construyó un plásmido con región temprana de HPV-18, que lleva un gen informador regulado por promotor de TK que permite la detección cuantitativa o semi-cuantitativa de ADN de HPV-18 mucosal extracromosómico de alto riesgo. El mapa del plásmido se presenta en la figura 23.

Los ejemplos 4-6 presentan una construcción basada en HPV, en la que los genes L1 y L2 se han eliminado y se han sustituido por un gen informador. Por consiguiente, se proporciona un instrumento útil para la evaluación cuantitativa o semicuantitativa de la cantidad de ADN extracromosómico replicado.

Ejemplo 7

Se completó un kit combinando la línea celular de osteosarcoma humano U2OS, plásmido de ADN de VPH extracromosómicamente conservable pUCHPV-18E-TKGluc, en el que los genes L1 y L2 están sustituidos con el gen marcador de luciferasa Gaussia. Esta construcción se transfeció en la línea celular U2OS, las líneas celulares estables se identificaron y cultivaron hasta confluencia. Cualquier biblioteca de compuestos químicos disponibles o generados por un experto en la técnica puede aplicarse al cultivo celular preconfluyente y / o confluyente para cribar los compuestos proporcionados de la biblioteca para su actividad anti-HPV en un estado de mantenimiento y / o amplificación constante de replicación del ADN viral. El gen informador de la luciferasa de Gaussia funciona como un medio para la evaluación cuantitativa o semicuantitativa del ADN extracromosómico replicado, ya que la cantidad del producto fluorescente del gen insertado es fácilmente detectable para una persona experta en la técnica ya sea cuantitativamente midiendo la fluorescencia o semi -cuantitativamente por observación visual con microscopio de fluorescencia.

Ejemplo 8

Un método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del ADN de HPV

- 5 Se introdujo la secuencia completa o parcial del ADN de HPV que porta todas las secuencias cis y trans-vectores vitales necesarias para todas las etapas de los ciclos de replicación vírica en la línea celular de osteosarcoma humano U2OS usando procedimientos de electro- copulación o transfección química conocidos en la art. Los clones de las líneas celulares U2OS que llevan plásmidos HPV de replicación extracromosómica se aislaron usando un marcador de selección que proporciona resistencia a G418. Se caracterizaron los clones de células identificadas que
- 10 portaban copias de HPV diferentes por célula, se crecieron y se generaron bancos de células de estos clones de células. Las células del subclon elegido para la identificación de inhibidores de replicación latentes de HPV se sembraron a baja densidad en placas de 96 pocillos, se añadieron candidatos de fármaco a diferentes concentraciones al medio de crecimiento y las células se cultivaron hasta confluir.
- 15 Alternativamente, las células pueden sembrarse en placas de 384 pocillos para aumentar el rendimiento. Como otra opción preferida, el cultivo celular se mantuvo durante al menos 5 a 7 días en las placas para que se convirtieran en confluentes, los potenciales candidatos a fármacos se añadieron al medio de crecimiento después de que las células se hubieran vuelto confluentes. El número de copias de copias extracromosómicas de HPV se determinó en las células por medición diferencial directa del ADN viral en las células o usando reporteros. Posteriormente, el
- 20 compuesto bajo investigación se aplicó al recipiente de cultivo de las monocapas de clones de células U2OS; la presencia o ausencia del efecto inhibidor del compuesto sobre la replicación estable o amplificadora de ADN viral en las células se evaluó midiendo la cantidad del producto del gen informador o la cantidad de ADN extracromosómico; finalmente se identificó el compuesto como un candidato para el inhibidor de la replicación del ADN de HPV, si se observa efecto inhibidor sobre la replicación del ADN de HPV de cierta concentración del compuesto a cierto nivel de
- 25 número de copias en determinada fase de crecimiento en ciertas condiciones de crecimiento.

ES 2 643 610 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> University of Tartu						
	Ustav, Mart						
	Ustav, Ene						
	Geimanen, Jelizaveta						
10	Pipit ,Regina						
	Isok-Paas, Helen						
	Reinson, Tormi						
	Ustav, Mart						
	Laos, Triin						
15	Orav, Marit						
	Salk, Kristiina						
	Männik, Andres						
	Remm, Anu						
20	<120> Método y kit para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del virus Papiloma Humano						
	<160> 3						
	<170> PatentIn Version 3.3						
25	<210> 1						
	<211> 7196						
	<212> DNA						
	<213> Artificial						
	<400> 1						
30							
	gtgtgtgtgt	atatatatat	acatctattg	ttgtgtttgt	atgtcctgtg	tttgtgtttg	60
	ttgtatgatt	gcattgtatg	gatatgatgg	ttgttgtttg	atgttgtatg	ttactatatt	120
	tgttggtatg	tggcattaaa	taaaatatgt	tttgtggttc	tgtgtgttat	gtggttgocg	180
35	cctagtgagt	aacaactgta	tttgtgtttg	tggatgggg	gttgcttggt	gggctatata	240
	ttgtcctgta	tttcaagtta	taaaactgca	caccttacag	catccatttt	atcctacaat	300
	cctccatttt	gctgtgcaac	cgatttcggg	tgcctttggc	ttatgtctgt	ggttttctgc	360
	acaatacagt	acgctggcac	tattgcaaac	tttaatcttt	tgggcaactg	tcctacatat	420
	tttgaacaat	tggcgcgcct	ctttggcgca	tataaggcgc	acctggtatt	agtcattttc	480
40	ctgtccaggt	gcgctacaac	aattgcttgc	ataactatat	ccactcccta	agtaataaaa	540
	ctgcttttag	gcacatattt	tagtttgttt	ttacttaagc	taattgcata	cttggcttgt	600
	acaactactt	tcatgtccaa	cattctgtct	acccttaaca	tgaactataa	tatgactaag	660
	ctgtgcatac	atagtttatg	caaccgaaat	aggttgggca	gcacatacta	tacttttcat	720
	taatactttt	aacaattgta	gtatataaaa	aagggagtaa	ccgaaaacgg	tcgggaccga	780
45	aaacggtgta	tataaaagat	gtgagaaaca	caccacaata	ctatggcgcg	ctttgaggat	840
	ccaacacggc	gacctacaa	gctacctgat	ctgtgcacgg	aactgaacac	ttcactgcaa	900
	gacatagaaa	taacctgtgt	atattgcaag	acagtattgg	aacttacaga	ggtatttgaa	960
	tttgcattta	aagatttatt	tgtggtgtat	agagacagta	taccccatgc	tgcatgccat	1020
	aaatgtatag	atTTTTattc	tagaattaga	gaattaagac	attattcaga	ctctgtgtat	1080
50	ggagaccacat	tggaaaaact	aactaacact	gggttataca	atTTattaat	aaggtgcctg	1140
	cggtgccaga	aaccgTTgaa	tccagcagaa	aaacttagac	acTTaatga	aaaacgcagc	1200
	tttcacaaca	tagctgggca	ctatagaggc	cagtgccatt	cgtgctgcaa	ccgagcagca	1260
	caggaacgac	tccaacgacg	cagagaaaca	caagtataat	attaagtatg	catggacctt	1320
	aggcaacatt	gcaagacatt	gtattgcatt	tagagcccca	aaatgaaatt	ccggttgacc	1380
55	ttctatgtca	cgagcaatta	agcgactcag	aggaagaaaa	cgatgaaata	gatggagtta	1440
	atcatcaaca	tttaccagcc	cgacgagccg	aaccacaacg	tcacacaatg	ttgtgtatgt	1500
	gttgtaagtg	tgaagccaga	attgagctag	tagtagaaag	ctcagcagac	gaccttcgag	1560
	cattccagca	gctgtttctg	aacaccctgt	cctttgtgtg	tccgtggtgt	gcatcccagc	1620
	agtaagcaac	aatggctgat	ccagaaggta	cagacgggga	gggcacgggt	tgtaacggct	1680
60	ggttttatgt	acaagctatt	gtagacaaaa	aaacaggaga	tgtaatatca	gatgacgagg	1740

ES 2 643 610 T3

acgaaaatgc aacagacaca gggtcggata tggtagatatt tattgataca caaggaacat 1800
 tttgtgaaca ggcagagcta gagacagcac aggcattggt ccatgvcgag gaggtccaca 1860
 atgatgcaca agtggttgc atgttttaaac gaaagtttgc aggagvcgagc acagaaaaa 1920
 gtccattagg ggagvcggctg gaggtggata cagagttaag tccacvggta caagaaatat 1980
 5 ctttaaatag tgggcagaaa aaggcaaaaa gvcggctggt tacaatatca gatagtggct 2040
 atggctgttc tgaagtggaa gcaacacaga ttcaggtaac tacaatggc gaacatggcg 2100
 gcaatgtatg tagtggcggc agtacvcgag ctatagacaa cgggggcaca gagggcaaca 2160
 acagcagtgt agacvcgtaca agtgacaata gcaatataga aatgtaaat ccacaatgta 2220
 10 ccatagcaca attaaaagac ttgttaaaag taacaataa acaaggagct atgttagcag 2280
 tatttaaaga cacatatggg ctatcattta cagatttagt tagaaatfff aaaagtgata 2340
 aaaccacgtg tacagattgg gttacagcta tatttggagt aaaccacaaca atagcagaag 2400
 gatttaaaac actaatacag ccatttataat tatatgccc tattcaatgt ctagactgta 2460
 aatggggagt attaatatta gccctggtgc gttacaaatg tggtaaagat agactaacag 2520
 15 ttgctaaagg tttaaagtacg ttgttacacg tacctgaaac ttgtatgta attcaaccac 2580
 caaaattvcg aagttagtgt gcagcactat attvgtatag aacaggaata tcaaatatta 2640
 gtgaagtaac gggagacaca cctgagtgga tacaagact tactattata caacatggaa 2700
 tagatgatag caattttgat ttgtcagaaa tggtaacaatg ggcatttgat aatgagctga 2760
 cagatgaaag cgatatggca tttgaaatag ccttattagc agacagcaac agcaatvcag 2820
 20 ctgcctffff aaaaagcaat tgccaagcta aatatttaaa agattgtgcc acaatgtgca 2880
 aacattatag gvcagcccaa aaocgacaaa tgaatatgtc acagtggata cgatttagat 2940
 gttcaaaaat agatgaaggg ggagattvga gaccaatagt gcaattcctg cgataccaac 3000
 aaatagagtt tataacattt ttaggagcct taaaatcatt tttaaaagga acccccaaaa 3060
 aaaattgttt agtattttgt ggaccagcaa atacaggaaa atcatatttt ggaatgagtt 3120
 25 ttatacactt tatacaagga gcagtaatat catttvtgaa ttccactagt cattttvtgt 3180
 tggaaaccgtt aacagatact aagvtggcca tvttagatga tvcacagacc acvtgttvgg 3240
 catactttga tacctatatg agaaatvcgt tagatvgcaa tccaataagt attgatagaa 3300
 agcaciaaac attaatacaa ctaaaatgtc ctccaatact actaaccaca aatatacatc 3360
 cagcaaagga taatagatvg ccataatvtg aaagtagaat aacagtatft gaatttccaa 3420
 30 atgcatttcc atvtgataaa aatvgcaatc cagtatatga aataaatgac aaaaattvga 3480
 aatgtfffft tgaaaggaca tvgvtccagat tagattvtga cvaggaagag gaagatvcag 3540
 acaccgaagg aaaccctttc ggaacvttta agvtvcgtgc aggacaaaat catagaccac 3600
 tatgaaaatg acagtaaaaga catagacagc caaatacagt attvgcaact aatacvtvtg 3660
 gaaaatgcaa tattctvtgc agcaagvgaa catvgcatic agacattaaa ccaccagvtg 3720
 35 vtgcccagct ataacatttc aaaaagtaaa gcacataaag ctattgaaat gcaaatvgcc 3780
 ctacaagvcc vtgcacaaaag tvcatacaaa accvgagvat ggacactvga agacacatvc 3840
 gaggaactat ggaatacaga acctactcac tvttttaaaa aagvtggcca aacagtaaaa 3900
 gtatatvtvt atvgcaacaa agacaattvt atgacctatg tagcatvggga cagvtvtgtat 3960
 tatatgactg atvcaggaac atvggacaaa accvtacct vtgtaaagtca cagvggvatg 4020
 40 tattatvtaa aggaagvggta caacacvttt tatatagaat ttaaaagtga atvtgaaaaa 4080
 tatvggaaaca cagvtacvtg ggaagtacat tvtvggaaata atvtaattga vtgtaatgac 4140
 tctatvtvga vtaccagvtga cvacacvggta tccvtactc agctvtgtaa acagvtacag 4200
 cacacccctc caccvtattc cagcaccvtg tccvtvggca ccgcaaaagac ctacvgccag 4260
 acvtcvgctg ctacacagacc tvgacactvt ggcactvcvg agaagcagca vtvtvgacct 4320
 45 vtcaaccac ttctcvgvtg agctacacct acagvgcaaca acaaaagacg gaaactctgt 4380
 agvtvgtaaca ctacvcctat aatacattta aaagvtgaca gaaacagvtft aaaatvtfta 4440
 cvgtacagat tvcgaaaaaca tagvcaccac tatagagata tatcatccac ctvgcattvg 4500
 acagvtvcag gcaatgaaaa aacaggaata ctgactvtaa cataccatag tgaaacacaa 4560
 agaacaaaaat ttttaaaatc tvtvtgcaatt ccagatagvtg tacaatatft gvtvggatac 4620
 50 atgacaatvt aatacatatg ctvtagtacc aatatvttat cacttatftt tttatftvtg 4680
 tttvtvtgtat gcatvtatvt vtvtvtccat vtccvcctft tvcctatctvt ctvtatvtgt 4740
 vcgtatvcat gvgtatvtvt attvtvtgtat atvtvtgtaa taacvtcccc tvcacagca 4800
 ttcacagvat atgtatftvt tftfttattg cccatvttac tattvcatat acatvcctata 4860
 vtvtctfttac agtaattvta tagvtvtvt tatacagvtg attvtacatt gtatatftvtg 4920
 tftftatacct tfttatvcftt vtvtatftft gtaataaaaag tatvgtatcc caccvtgccc 4980
 55 cacgacgcaa acvggctvtg gtaactgact tatataaaac atvtaaaaca tctvgtacat 5040
 vtccacctga tvtvtvtctc aagvtvgagv gcaacacvt agcagataaa atattvcaat 5100
 gvtcaagcct tvgtatatft tvgvgvtgac vtvgcatagv tactvgcagv gvtacagvgg 5160
 vtctgtacagv gtacattcca tvgvgvtgvc gvtccaatac agvtvgvtgvt gvtvgvtcta 5220
 cacvtcccc atvgvtatft gaacctvtvg gccvcgatcc aagcttacga aagvgcctvcg 5280

ES 2 643 610 T3

	tgatacgcct	atTTTTatag	gttaatgtca	tgataataat	ggtttcttag	acgtcaggtg	5340
	gcacttttcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatTTgttt	atTTTTctaa	atacattcaa	5400
	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccc	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	5460
	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	ctTTTTtgcg	gcattttgcc	5520
5	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	5580
	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	5640
	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	5700
	tatcccgtat	tgacgcgggg	caagagcaac	tcggtcgccc	catacactat	tctcagaatg	5760
	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcctac	ggatggcatg	acagtaagag	5820
10	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	ggccaactta	cttctgacaa	5880
	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	catgtaactc	5940
	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	cgtgacacca	6000
	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaactatt	aactggcgaa	ctacttactc	6060
	tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tgaggcgga	taaagttgca	ggaccacttc	6120
15	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	ggtgagcgtg	6180
	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctcccgt	atcgtagtta	6240
	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	gctgagatag	6300
	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	atactttaga	6360
	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	6420
20	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	6480
	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaaaa	6540
	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggttttgt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	6600
	cgaaggtaac	tggttccagc	agagcgcaga	taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	6660
	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatac	6720
25	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	6780
	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	6840
	gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	tgagaaaagc	8900
	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggg	aagcggcagg	gtcggaacag	6960
	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	7020
30	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	7080
	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	aagcttagat	ctcggctagc	tagtacttaa	ttaacctaag	7140
	gcactacgtc	ttctaaacct	gccaagcgtg	tgcgtgtacg	tgccaggaag	taatat	7196

35	<210> 2
	<211> 8230
	<212> DNA
	<213> Artificial
40	<400> 2

	gtgtgtgtgt	atatatatat	acatctattg	ttgtgtttgt	atgtcctgtg	tttgtgtttg	60
	ttgtatgatt	gcattgtatg	gtatgtatgg	ttgttgtttg	atggtgtatg	ttactatatt	120
45	tgttggatag	tgccattaaa	taaaatatgt	tttgtggttc	tgtgtgttat	gtggttgcgc	180
	cctagtgagt	aacaactgta	tttgtgtttg	tggtatgggt	gttgcttgtt	gggctatata	240
	ttgtcctgta	tttcaagtta	taaaactgca	caccttacag	catccatttt	atcctacaat	300
	cctccatttt	gctgtgcaac	cgatttcggg	tgcccttggc	ttatgtctgt	ggttttctgc	360
	acaatacagt	acgctggcac	tattgcaaac	tttaatcttt	tgggcaactgc	tcctacatat	420
50	tttgaacaat	tggcgcgcct	ctttggcgca	tataaggcgc	acctggatt	agtcattttc	480
	ctgtccaggt	gcgctacaac	aattgcttgc	ataactatat	ccactcccta	agtaataaaa	540
	ctgcttttag	gcacatattt	tagtttgttt	ttacttaagc	taattgcata	cttggttgt	600
	acaactactt	tcatgtccaa	cattctgtct	acccttaaca	tgaactataa	tatgactaag	660
	ctgtgcatac	atagttttatg	caaccgaaat	aggttgggca	gcacatacta	tacttttcat	720
55	taatactttt	aacaattgta	gtatataaaa	aagggagtaa	ccgaaaacgg	tcgggaccga	780
	aaacggtgta	tataaaagat	gtgagaaaca	caccacaata	ctatggcgcg	ctttgaggat	840
	ccaacacggc	gaccctacaa	gctacctgat	ctgtgcacgg	aactgaacac	ttcactgcaa	900
	gacatagaaa	taacctgtgt	atattgcaag	acagtattgg	aacttacaga	ggtatttgaa	960
	tttgcattta	aagattttatt	tgtgggtgat	agagacagta	taccccatgc	tgcatgccat	1020
60	aaatgtatag	atTTTTtattc	tagaattaga	gaattaagac	attattcaga	ctctgtgtat	1080

ES 2 643 610 T3

ggagacacat tggaaaaact aactaacact gggttataca atttattaat aaggtgcctg 1140
 cgggtgccaga aaccggtgaa tccagcagaa aaacttagac accttaatga aaaacgcagca 1200
 tttcacaaca tagctgggca ctatagaggc cagtgccatt cgtgctgcaa ccgagcacga 1260
 caggaacgac tccaacgacg cagagaaaca caagtataat attaagtatg catggacctg 1320
 5 aggcaacatt gcaagacatt gtattgcatt tagagcccca aatgaaatt ccggttgacc 1380
 ttctatgtca cgagcaatta agcgactcag aggaagaaaa cgatgaaata gatggagtta 1440
 atcatcaaca tttaccagcc cgacgagccg aaccacaacg tcacacaatg ttgtgtatgt 1500
 gttgtaagtg tgaagccaga attgagctag tagtagaaag ctacgacagac gaccttcgag 1560
 cattccagca gctgtttctg aacaccctgt cctttgtgtg tccgtgggtg gcatcccagc 1620
 10 agtaagcaac aatggctgat ccagaaggta cagacgggga gggcacgggt tgtaacggct 1680
 ggttttatgt acaagctatt gtagacaaaa aaacaggaga tgtaatatca gatgacgagg 1740
 acgaaaaatgc aacagacaca gggtcggata tggtagattt tattgataca caaggaacat 1800
 tttgtgaaca ggcagagcta gagacagcac aggcattggt ccatgcgagc gaggtccaca 1860
 atgatgcaca agtgttgcat gttttaaaaa gaaagtttgc aggaggcagc acagaaaaa 1920
 15 gtccattagg ggagcggctg gaggtggata cagagttaag tccacgggta caagaaatg 1980
 ctttaaatag tgggcagaaa aaggcaaaaa ggcggctggt tacaatatca gatagtggct 2040
 atggctgttc tgaagtggaa gcaacacaga ttcaggtaac tacaatggc gaacatggcg 2100
 gcaatgtatg tagtggcggc agtacggagg ctatagacaa cgggggcaca gagggcaaca 2160
 acagcagtgt agacggtaca agtgacaata gcaatataga aatgtaaat ccacaatgta 2220
 20 ccatagcaca attaaaagac ttgttaaaag taacaataa acaaggagct atgttagcag 2280
 tatttaaaga cacatatggg ctatcattta cagatttagt tagaaatttt aaaagtgata 2340
 aaaccacgtg tacagattgg gttacagcta tatttgaggt aaaccaaca atagcagaag 2400
 gatttaaaac actaatacag ccatttatat tatatgccca tattcaatgt ctagactgta 2460
 aatggggagt attaatatta gccctgttgc gttacaaatg tggtaaagt agactaacag 2520
 25 ttgctaaagg ttaagtacg ttgttacacg tacctgaaac ttgtatgta attcaaccac 2580
 caaaattgcg aagtagtggt gcagcactat attggtatag aacaggaata tcaaatatta 2640
 gtgaagtaat gggagacaca cctgagtggg tacaagact tactattata caacatggaa 2700
 tagatgatag caattttgat ttgtcagaaa tggtaacaat ggcatattgat aatgagctga 2760
 cagatgaaag cgatatggca tttgaaatag ccttattagc agacagcaac agcaatgcag 2820
 30 ctgccttttt aaaaagcaat tgccaagcta aatatttaaa agattgtgcc acaatgtgca 2880
 aacattatag gcgagcccaa aaacgacaaa tgaatatgtc acagtggata cgatttagat 2940
 gttcaaaaaa agatgaaggg ggagattgga gaccaatagt gcaattcctg cgataccaac 3000
 aatatagatt tataacattt ttaggagcct taaaatcatt tttaaaagga cccccaaaa 3060
 aaaattgttt agtattttgt ggaccagcaa atacaggaaa atcatatttt ggaatgagtt 3120
 35 ttatacactt tatacaagga gcagtaatat catttgtgaa ttccactagt catttttgggt 3180
 tggaaaccgtt aacagatact aaggtggcca tggtagatga tgcaacgacc acgtgttggg 3240
 catactttga tacctatatg agaaatgctg tagatggcaa tccaataagt attgatagaa 3300
 agcaciaaac attaatacaa ctaaaatgtc ctccaatact actaaccaca aatatacatc 3360
 cagcaaagga taatagatgg ccatatttag aaagtagaat aacagtattt gaatttcaa 3420
 40 atgcatttcc atttgataaa aatggcaatc cagtatatga aataaatgac aaaaattgga 3480
 aatgtttttt tgaaggaca tgggtccagat tagatttgca cgaggaagag gaagatgcag 3540
 acaccgaagg aaaccctttc ggaacgttta agttgcgtgc aggacaaaat catagaccac 3600
 tatgaaaatg acagtaaaga catagacagc caatacagt attggcaact aatacgttgg 3660
 gaaaatgcaa tattctttgc agcaagggaa catggcatac agacattaaa ccaccagggtg 3720
 45 gtgccagcct ataacatttc aaaaagtaaa gcacataaag ctattgaaact gcaaatggcc 3780
 ctacaaggcc ttgcacaaaag tcgatacaaa accgaggatt ggacactgca agacacatgc 3840
 gaggaactat ggaatacaga acctactcac tgctttaaaa aaggtggcca aacagtacaa 3900
 gtatattttg atggcaacaa agacaattgt atgacctatg tagcatggga cagtgtgtat 3960
 tatatgactg atgcaggaac atgggacaaa accgctacct gtgtaagtca caggggattg 4020
 50 tattatgtaa aggaagggtg caacacgttt tatatagaat ttaaaagtga atgtgaaaa 4080
 tatgggaaca caggtacgtg ggaagtacat tttgggaata atgtaattga ttgtaatgac 4140
 tctatgtgca ctaccagtga cgacacggta tccgctactc agcttgtaa acagctacag 4200
 cacacccct caccgtattc cagcaccgtg tccgtgggca cgcgaaagac ctacggccag 4260
 acgtcggctg ctacacgacc tggacactgt ggactcgcgg agaagcagca ttgtggacct 4320
 55 gtcaaccac ttctcgggtg agctacacct acaggcaaca acaaaagacg gaaactctgt 4380
 agtggtaaca ctacgcctat aatacattta aaaggtgaca gaaacagttt aaaatgttta 4440
 cggtagacat tgcgaaaaca tagcgaccac tatagagata tatcatccac ctggcattgg 4500
 acaggtgcag gcaatgaaaa aacaggaata ctgactgtaa cataccatag tgaaacacaa 4560
 agaacaaaaa ttttaaatc tgttgcaatt ccagatagtg tacaatatatt ggtgggatac 4620

ES 2 643 610 T3

atgacaatgt aatacatatg ctgtagtacc aatatgttat cacttatttt tttatttttg 4680
 ttttgtgat gcatgtatgt gtgctgccat gtcccgttt tgccatctgt ctgtatgtgt 4740
 gcgtatgcat gggattgggt atttgtgat attgtggtaa taacgtcccc tgccacagca 4800
 ttcacagtat atgtattttg tttttattg cccatgttac tattgcatat acatgctata 4860
 5 ttgtctttac agtaattgta taggttgttt tatacagtgt attgtacatt gtatatattt 4920
 ttttatacct tttatgcttt ttgtattttt gtaataaaaag tatggtatcc caccgtgccg 4980
 cacgacgcaa acgggcttcg gtaactgact tatataaaac atgtaaacia tctggtacat 5040
 gtccacctga tgttgttcc t aagggtggagg gcaccacgtt agcagataaa atattgcaat 5100
 10 ggtcaagcct tgggtatatt ttgggtggac ttggcatagg tactggcagt ggtacagggg 5160
 gtcgtacagg gtacattcca ttgggtgggc gttccaatac agtgggtggat gttggctcta 5220
 cacgtcccc agtgggtatt gaacctgtgg gcccgatcc aagcttacga aagggcctcg 5280
 tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg 5340
 gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa 5400
 15 atatgtatcc gctcatgaga caataaccc gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 5460
 agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg ccttattcc cttttttgcg gcattttgcc 5520
 ttctgtttt tgctcaccca gaaacgtctg tgaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 5580
 gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 5640
 gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 5700
 20 tatcccgtat tgacgcggg caagagcaac tccgtcgcgg catacactat tctcagaatg 5760
 acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 5820
 aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 5880
 cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcaaa catgggggat catgtaactc 5940
 gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 6000
 25 cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gaaactatt aactggcgaa ctacttactc 6060
 tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc 6120
 tgcgctcggc ctttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 6180
 ggtctcgcgg tatcattgca gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 6240
 tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 6300
 30 gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 6360
 ttgattttaa actttcattt taatttataa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 6420
 tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 6480
 agatcaaagg atcttcttga gatcctttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaaaa 6540
 aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgcggatca agagctacca actctttttc 6600
 35 cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccataac tgtccttcta gtgctccgt 6660
 agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatacc 6720
 tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 6780
 gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 6840
 gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaaagcg 6900
 40 ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 6960
 gagagcgcac gagggagctt ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 7020
 ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 7080
 ggaaaaacgc cagcaacgcg aagcttagat ctccgctagc gtatacggat cgatcctgca 7140
 ggtcgcactc agacaggtaa gtggcgttt tccgggagcc agctgcgtcc gctgtcgtgc 7200
 45 tgtcgggtga gtactagcaa gcgttaagtc cccatctggc tgcggcctac cgaagagtgg 7260
 tcttcacgtc acacgctgtc ccacgcacgt ggttggtttg gtcgcttctg gttactgact 7320
 actaagcagc cttttctttt ttcttttcag gttctagacg ccaccatggg cgtgaagggtg 7380
 ctggtcggcc tgatctgtat cgcgctggcc gaggccaagc ccaccgagaa caacgaggac 7440
 ttcaacatcg tggcctggc cagcaacttc gccaccacag acctggacgc cgacagaggc 7500
 50 aagctgccc gcaagaaact gccctggaa gtgctgaaag agatggaagc caacgccaga 7560
 aaggcggct gcaacagagg ctgctgac tgcctgagcc acatcaagt caccctcaag 7620
 atgaagaagt tcatccccg cagatgccc acctacgagg gcgacaaaaga gagcgcctcag 7680
 ggcggcatcg gcgagccatc cgtggacatc cccgagatcc cgggcttcaa ggacctggaa 7740
 cccatggaac agtttatcgc ccaggtggac ctgtgcgtgg actgcaccac cggctgtctg 7800
 55 aaggcctgg ccaacgtgca gtgcagcgac ctgctgaaga agtggctgcc ccagagatgc 7860
 gccaccttcg ccagcaagat ccagggccag gtggacaaga tcaaggcgc tggcggcgac 7920
 tgatgagcgg ccgcctcgag ctgcctgac agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc 7980
 atctgttgtt tgccccctcc cgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt 8040
 ctttctctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct 8100
 60 ggggggtgg gtggggcagg acagcaagg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc 8160
 ttaattaacc taaggcacta cgtcttctaa acctgccaag cgtgtgcgtg tacgtgccag 8220

ES 2 643 610 T3

gaagtaatat

8230

- 5 <210> 1
- <211> 8983
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <400> 3

10

	gtgtgtgtgt	atatatatat	acatctattg	ttgtgtttgt	atgtcctgtg	tttgtgtttg	60
	ttgtatgatt	gcattgtatg	gtatgtatgg	ttgttgttgt	atgttgtatg	ttactatatt	120
	tgttggtagt	tggcattaaa	taaaatatgt	tttgtggttc	tgtgtgttat	gtggttgccg	180
15	cctagttagt	aacaactgta	tttgtgtttg	tggtatgggt	gttgcttggt	gggctatata	240
	ttgtcctgta	tttcaagtta	taaaactgca	caccttacag	catccatttt	atcctacaat	300
	cctccatttt	gctgtgcaac	cgatttcggg	tgcccttggc	ttatgtctgt	ggttttctgc	360
	acaatacagt	acgctggcac	tattgcaaac	tttaatcttt	tgggcactgc	tcctacatat	420
	tttgaacaat	tggcgcgcct	ccttggcgca	tataaggcgc	acctggtatt	agtcattttc	480
20	ctgtccaggt	gcgctacaac	aattgcttgc	ataactatat	ccactcccta	agtaataaaa	540
	ctgcttttag	gcacatattt	tagtttgttt	ttacttaagc	taattgcata	cttggcttgt	600
	acaactactt	tcatgtccaa	cattctgtct	acccttaaca	tgaactataa	tatgactaag	660
	ctgtgcatac	atagtttatg	caaccgaaat	aggttgggca	gcacatacta	tacttttcat	720
	taatactttt	aacaattgta	gtatataaaa	aagggagtaa	ccgaaaacgg	tcgggaccga	780
25	aaacggtgta	tataaaagat	gtgagaaaca	caccacaata	ctatggcgcg	ctttgaggat	840
	ccaacacggc	gaccctacaa	gctacctgat	ctgtgcacgg	aactgaacac	ttcactgcaa	900
	gacatagaaa	taacctgtgt	atattgcaag	acagtattgg	aacttacaga	ggtatttgaa	960
	tttgcattta	aagattttatt	tgtgggtgat	agagacagta	taccccatgc	tgcatgccat	1020
	aaatgtatag	atTTTTtattc	tagaattaga	gaattaagac	attattcaga	ctctgtgtat	1080
30	ggagacacat	tggaaaaact	aactaacact	gggttataca	atTTtattaat	aaggtgcctg	1140
	cggtgccaga	aaccgTTgaa	tccagcagaa	aaacttagac	accttaatga	aaaacgcagc	1200
	tttcacaaca	tagctgggca	ctatagaggc	cagtgccatt	cgtgctgcaa	ccgagcacga	1260
	caggaacgac	tccaacgacg	cagagaaaac	caagtataat	attaagtatg	catggaccta	1320
	aggcaacatt	gcaagacatt	gtattgcatt	tagagcccca	aaatgaaatt	ccggttgacc	1380
35	ttctatgtca	cgagcaatta	agcgactcag	aggaagaaaa	cgatgaaata	gatggagtta	1440
	atcatcaaca	tttaccagcc	cgacgagccg	aaccacaacg	tcacacaatg	ttgtgtatgt	1500
	gttgtaagtg	tgaagccaga	attgagctag	tagtagaaag	ctcagcagac	gaccttcgag	1560
	cattccagca	gctgTTTTctg	aacaccctgt	cctttgtgtg	tccgtgggtg	gcatcccagc	1620
	agtaagcaac	aatggctgat	ccagaaggta	cagacgggga	gggcacgggt	tgtaacggct	1680
40	ggttttatgt	acaagctatt	gtagacaaaa	aaacaggaga	tgtaatatca	gatgacgagg	1740
	acgaaaatgc	aacagacaca	gggtcggata	tggtagattt	tattgataca	caaggaacat	1800
	tttgtgaaca	ggcagagcta	gagacagcac	aggcattggt	ccatgcccag	gaggtccaca	1860
	atgatgcaca	agtgttgcac	gttttaaaac	gaaagtttgc	aggagggcag	acagaaaaaca	1920
	gtccattagg	ggagcggctg	gaggtggata	cagagttaag	tccacgggta	caagaaatat	1980
45	ctttaaatag	tgggcagaaa	aaggcaaaaa	ggcggctggt	tacaatatca	gatagtggct	2040
	atggctgttc	tgaagtggaa	gcaacacaga	ttcaggtaac	tacaaatggc	gaacatggcg	2100
	gcaatgtatg	tagtggcggc	agtacggagg	ctatagacaa	cgggggcaca	gagggcaaca	2160
	acagcagtg	agacgggtaca	agtgacaata	gcaatataga	aatgtaaat	ccacaatgta	2220
	ccatagcaca	attaaaagac	ttgttaaaaag	taaacaataa	acaaggagct	atgttagcag	2280
50	aaaccacgtg	tacagattgg	gttacagcta	tatttggagt	aaaccaca	atagcagaag	2400
	gatttaaaac	actaatacag	ccatttatat	tatatgccca	tattcaatgt	ctagactgta	2460
	aatggggagt	attaatatta	gccctgttgc	gttacaatg	tggtaagagt	agactaacag	2520
	ttgctaaagg	tttaagtacg	ttgttacacg	tacctgaaac	ttgtatgtta	attcaaccac	2580
	caaaattgcg	aagtagtggt	gcagcactat	attggtatag	aacaggaata	tcaaatatta	2640
55	gtgaagtaat	gggagacaca	cctgagtggg	tacaaagact	tactattata	caacatggaa	2700
	cagatgaaag	cgatatggca	tttgaatatg	ccttattagc	agacagcaac	agcaatgcag	2820
	ctgccttttt	aaaaagcaat	tgccaagcta	aatatttaaa	agattgtgcc	acaatgtgca	2880
	aacattatag	gcgagcccaa	aaacgacaaa	tgaatatgtc	acagtggata	cgatttagat	2940
	gttcaaaaaat	agatgaaggg	ggagattgga	gaccaatagt	gcaattcctg	cgataccaac	3000
60	aaatagagtt	tataacattt	ttaggagcct	taaaatcatt	tttaaaagga	acccccaaaa	3060

ES 2 643 610 T3

	aaaattgttt	agtattttgt	ggaccagcaa	atacaggaaa	atcatatttt	ggaatgagtt	3120
	ttatacactt	tatacaagga	gcagtaatat	catttgtgaa	ttccactagt	catttttggg	3180
	tggaaccggt	aacagatact	aagggtggcca	tgtagatga	tgcaacgacc	acgtgttggg	3240
	catactttga	tacctatatg	agaaatgctg	tagatggcaa	tccaataagt	attgatagaa	3300
5	agcaciaaacc	attaatacaa	ctaaaatgtc	ctccaatact	actaaccaca	aatatacatc	3360
	cagcaaagga	taatagatgg	ccatatttag	aaagtagaat	aacagtattd	gaatttccaa	3420
	atgcatttcc	attdtgataaa	aatggcaatc	cagtatatga	aataaatgac	aaaaattgga	3480
	aatgtttttt	tgaaaggaca	tggtccagat	tagatttgca	cgaggaagag	gaagatgcag	3540
	acaccgaagg	aaaccctttc	ggaacgttta	agttgcgtgc	aggacaaaat	catagaccac	3600
10	tatgaaaatg	acagtaaaga	catagacagc	caaatacagt	attggcaact	aatacgdtgg	3660
	gaaaatgcaa	tattctttgc	agcaagggaa	catggcatac	agacattaaa	ccaccaggtg	3720
	gtgccagcct	ataacatttc	aaaaagtaaa	gcacataaag	ctattgaaact	gcaaatggcc	3780
	ctacaaggcc	ttgcacaaaag	tcgatacaaaa	accgaggatt	ggacactgca	agacacatgc	3840
	gaggaactat	ggaatacaga	acctactcac	tgctttaaaa	aagggtggcca	aacagtacaa	3900
15	gtatatdttg	atggcaacaa	agacaattgt	atgacctatg	tagcatggga	cagtgtgtat	3960
	tatatgactg	atgcaggaac	atgggacaaa	accgctacct	gtgtaagtca	caggggattg	4020
	tattatgtaa	aggaagggtg	caacacgttt	tatatagaat	ttaaaagtga	atgtgaaaaa	4080
	tatgggaaca	caggtacgtg	ggaagtacat	tttgggaata	atgtaattga	ttgtaatgac	4140
	tctatgtgca	gtaccagtga	cgacacggta	tcgctactc	agcttggtta	acagctacag	4200
20	cacacccctc	caccgtattd	cagcacctgt	tcgctgggca	ccgcaaagac	ctacggccag	4260
	acgtcggctg	ctacacgacc	tggaactgtg	ggactcgcgg	agaagcagca	ttgtggacct	4320
	gtcaaccac	ttctcgggtg	agctacacct	acaggcaaca	acaaaagacg	gaaactctgt	4380
	agtggtaaca	ctacgcctat	aatacatttd	aaagggtgaca	gaaacagtdt	aaaatgttda	4440
	cggtacagat	tgcgaaaaca	tagcgaccac	tatagagata	tatcatccac	ctggcattgg	4500
25	acaggtgcag	gcaatgaaaa	aacaggaata	ctgactgtaa	cataccatag	tgaaacacaa	4560
	agaacaaaat	ttttaaatat	tgtdtgaatt	ccagatagtg	tacaaatatt	ggtgggatac	4620
	atgacaatgt	aatacatatg	ctgtagtacc	aatatgtdat	cacttdattd	tttdattdtgc	4680
	tttdgtgtat	gcatgtatgt	gtgctgccat	gtcccgttd	tgccatctgt	ctgtatgtgt	4740
	gcgtatgcat	gggtatdgg	attdgtgtat	attdgtgtda	taacgtcccc	tgccacagca	4800
30	ttcacagtat	atgtattdtg	tttdtdattd	cccatgtdac	tattdcatat	acatgctata	4860
	ttgtcttdtac	agtaatdtda	taggttdtdt	tatacagtdt	attdgtacatt	gtatattdtdg	4920
	tttdtatact	tttdatgcttd	ttgtattdtd	gtaataaaaag	tatdgtatcc	caccgtgccg	4980
	cacgacgcaa	acgggcttdc	gtaactgact	tataaaaac	atgtaaacaa	tctdgtgcat	5040
	gtcccactga	tgtdtdtct	aaggtdggag	gcaccacgtt	agcagataaa	atattgcaat	5100
35	ggtcaagcct	tggtatattd	ttgggtggac	ttggcatagg	tactggcagt	ggtacagggg	5160
	gtcgtacag	gtacattcca	ttgggtgggc	gttccaatac	agtggtdggat	gtdggtdccta	5220
	cacgtcccc	agtgdtdtatt	gaacctgtgg	gcccggatcc	aagcttdacga	aagggcctcg	5280
	tgatacgct	attdtdtatag	gttaatgtca	tgataataat	ggttdcttdag	acgtcaggtg	5340
	gcacttdtdc	gggaaatgtg	cgcggaacct	ctattdgttd	attdtdtctaa	atacattcaa	5400
40	atatgtatcc	gctcatgaga	caataacct	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	5460
	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttdattd	cttdtdtdtgcg	gcatttdtgc	5520
	ttcctgttdt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtdaa	agatgctgaa	gatcagtdtdg	5580
	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagtdtdt	5640
	gccccgaaga	acgttdtdcca	atgatgagca	cttdtdaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	5700
45	tatcccgtat	tgacgcggg	caagagcaac	tcggtcgcgg	catacactat	tctcagaatg	5760
	acttdgtdtd	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttd	ggatggcatg	acagtdaagag	5820
	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtd	ataacactgc	ggccaacttd	cttdctgacaa	5880
	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	tttdtgcaaa	catdggggat	catgtdaactc	5940
	gccttdgatcg	ttgggaaccg	gagctgaaatg	aagccatacc	aaacgacgag	cgtgacacca	6000
50	cgatgcctgt	agcaatdtdca	acaacgttdc	gcaactattd	aactdggcga	ctacttdactc	6060
	tagcttdccc	gcaacaattda	atagactgga	tggaagcggg	taaagtdtdca	ggaccacttd	6120
	tgctcctcgg	ccttdccggt	ggctgdtdtd	ttgctgataa	atctdggagcc	ggtgagcgtg	6180
	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactdgggg	cagatdgttda	gcccctcccgt	atcgtagtda	6240
	tctacacgac	ggggagtdcag	gcaactatd	atgaaacgaaa	tagacagatc	gctgagatag	6300
55	gtgcctcact	gattaagcat	tgtdtaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	atacttdtdaga	6360
	tcatgaccaa	.aatcccttda	cgtgagtdtd	cgtdtdcactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	6480
	agatcaaagg	atcttdcttdga	gatccttdtd	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacaa	6540
	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggttdtdg	tgccggatca	agagctacca	actcttdtdt	6600
	cgaaggtaac	tggttdtcagc	agagcgcaga	taccaaatat	tgtdccttdca	gtgtagccgt	6660

ES 2 643 610 T3

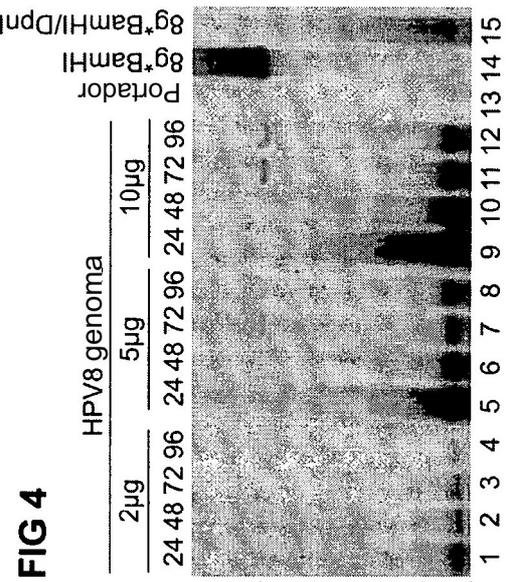
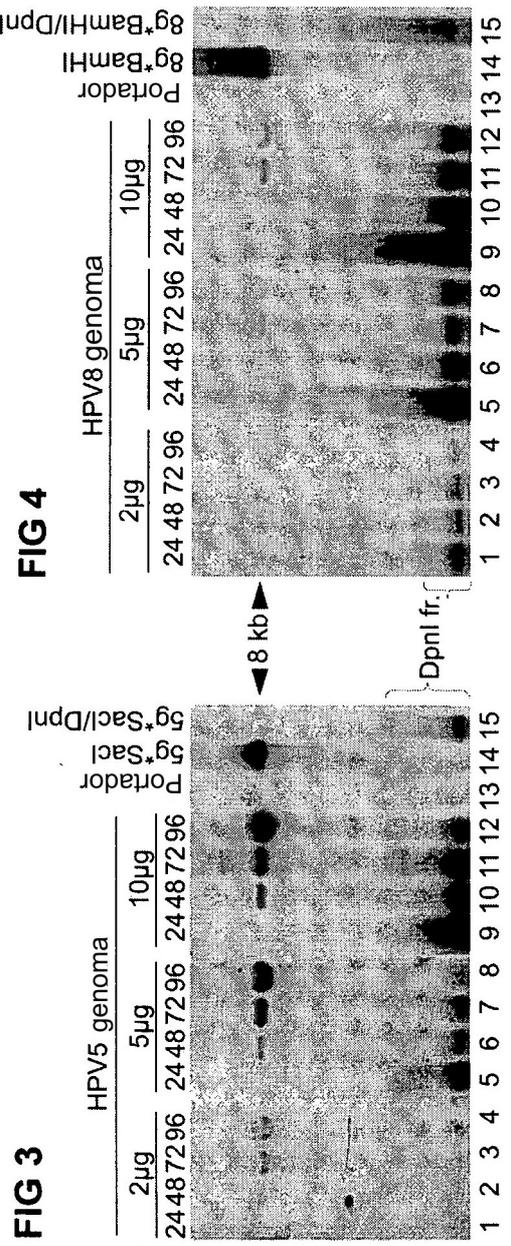
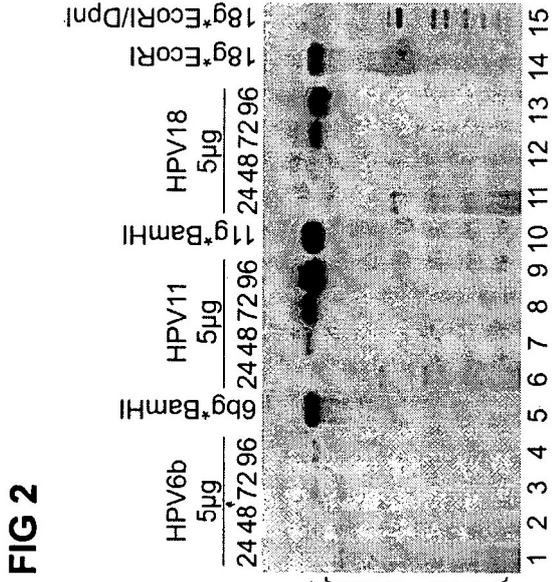
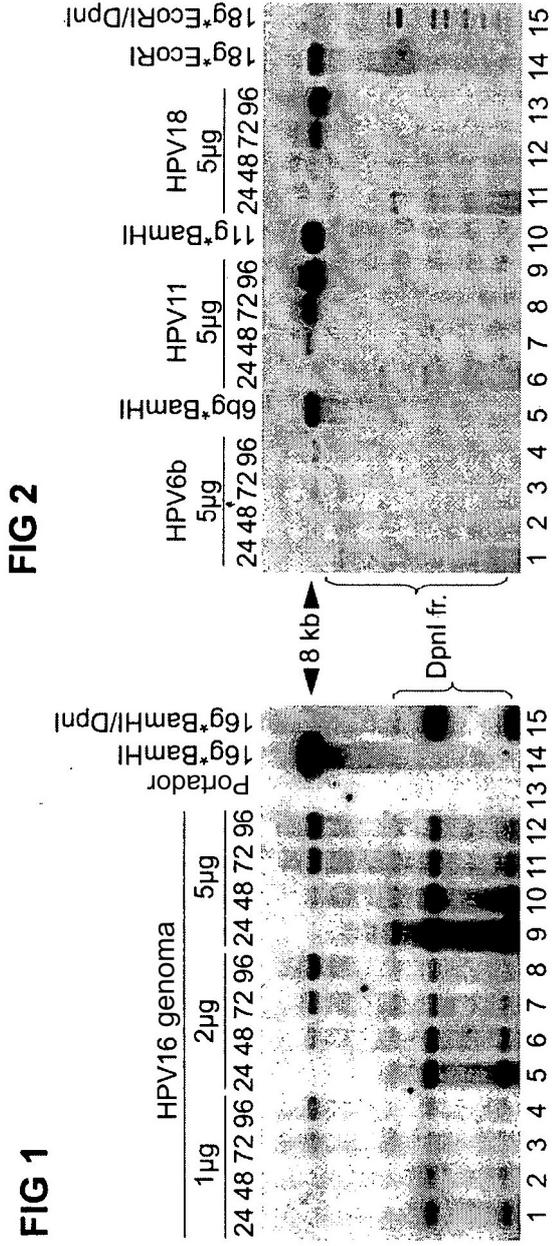
	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	6780
	gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	6900
	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaaacag	6960
	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	7020
5	ttcgccacct	ctgacttgag	cgctcgatfff	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	7080
	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	aagcttagat	ctaaatgagt	cttcggacct	cgcgggggcc	7140
	gcttaagcgg	tggttaggg	ttgtctgacg	cggggggag	gggaaggaac	gaaacactct	7200
	cattcggagg	cggtcgggg	tttggctctt	gtggccacgg	gcacgcagaa	gagcgcccg	7260
	atcctcttaa	gcaccccc	gccctccgtg	gaggcgggg	tttggctcgg	gggtggtaac	7320
10	tggcggggcc	ctgactcggg	cgggtcgcgc	gccccagagt	gtgacctfff	cggctcgtc	7380
	gcagacccc	gggcggcgcc	gcccggcgcg	cgacgggctc	gctgggtcct	aggctccatg	7440
	gggaccgcat	acgtggacag	gctctggagc	atccgcacga	ctgcggtgat	attaccggag	7500
	accttctgcg	ggacgagccg	ggtcacgcgg	ctgacgcgga	gcgtccggtt	ggcgacaaac	7560
	accaggacgg	ggcacaggta	cactatcttt	tcacccggag	gcgcgaggg	ctgcaggagc	7620
15	tcccggaag	ggcgcagctg	cttcacccc	gtggcccgtt	gctcgcggtt	gctggcggtg	7680
	tccccggaag	aaatatatff	gcatgtctff	agttctatga	tgacacaaac	cccggccagc	7740
	gtcttgtcat	tgccgaattc	gaacacgcag	atgcagtcgg	ggcgccgcgg	tcccaggtcc	7800
	acttcgcata	ttaaggtgac	gcgtgtggcc	tcgaacaccg	agcgaccctg	cagcgacccg	7860
	cttaaaagct	agcgtatacg	gatcgatcct	gcaggtcgac	tctagacagg	taagtggcgt	7920
20	ttctcgggga	gccagctgcg	tccgctgtcg	tgtctcgggt	gtagtactag	caagcgttaa	7980
	gtccccatct	ggctgcggcc	taccgaagag	tggctttcac	gtcacacgct	gtcccacgca	8040
	cgtggtttggt	ttggctcgctt	ctggttactg	actactaagc	agccttttct	tttttccttt	8100
	caggttctag	acgccaccat	gggcgtgaag	gtgctgttcg	ccctgatctg	tatcgccgtg	8160
	gccgaggcca	agcccaccga	gaacaacgag	gacttcaaca	tcgtggccgt	ggccagcaac	8220
25	ttcgccacca	cagacctgga	cgccgacaga	ggcaagctgc	ccggcaagaa	actgcccctg	8280
	gaagtgctga	aagagatgga	agccaacgcc	agaaaggccg	gctgcaccag	aggctgcctg	8340
	atctgcctga	gccacatcaa	gtgcacccc	aagatgaaga	agttcatccc	cggcagatgc	8400
	cacacctacg	agggcgacaa	agagagcgcc	cagggcggca	tcggcgaggc	catcgtggac	8460
	atccccgaga	tccccggctt	caaggacctg	gaacccatgg	aacagtttat	cgcccagggtg	8520
30	gacctgtgcg	tggactgcac	caccggctgt	ctgaagggcc	tggccaacgt	gcagtgcagc	8580
	gacctgctga	agaagtggct	gccccagaga	tgcgccacct	tcgccagcaa	gatccagggc	8640
	caggtggaca	agatcaaggg	cgctggcgcc	gactgatgag	cgcccgctc	gagctcgtc	8700
	atcagcctcg	actgtgcctt	ctagttgcca	gccatctggt	gtttgcccct	ccccgtgcc	8760
	ttccttgacc	ctggaaggtg	ccactcccac	tgtcctttcc	taataaaatg	aggaaattgc	8820
35	atcgcattgt	ctgagtaggt	gtcattctat	tctgggggg	gggggtgggg	aggacagcaa	8880
	gggggaggat	tgggaagaca	atagcaggca	tgtttaatta	acctaaggca	ctacgtcttc	8940
	taaacctgcc	aagcgtgtgc	gtgtacgtgc	caggaagtaa	tat		8983

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación del Virus del Papiloma Humano (HPV) en la replicación inicial de amplificación, el mantenimiento estable o la fase amplificadora vegetativa, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
- 10 A. introducir ADN genómico o subgenómico de HPV en una línea de células U2SO de osteosarcoma humano que permite fases de replicación inicial, de mantenimiento estable y de replicación tardía del ciclo de replicación del ADN de HPV;
- B. generar una colección de subclones de células individuales estables que llevan ADN de HPV extracromosómico a diferentes números de copias por subclon;
- C. cultivar células de subclones seleccionados como cultivos en monocapa dispersos y / o densos con medios regulares;
- 15 D. aplicar el compuesto investigado al recipiente de cultivo con la monocapa del subclón de la línea celular que lleva el ADN del VPH;
- E. evaluar la presencia o ausencia de efecto inhibitor del compuesto sobre el mantenimiento y / o la amplificación del ADN viral en las células;
- 20 F. si se observa el efecto inhibitor sobre la replicación del ADN del VPH de una cierta concentración de un compuesto, el compuesto se identifica como un candidato para el inhibitor de la replicación del ADN del VPH.
- 25 2. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto investigado se aplica a la monocapa de subclón celular antes de obtener confluencia; y el inhibitor de HPV está destinado a inhibir la fase latente de la replicación del ADN del VPH.
- 30 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el cultivo del subclón se mantiene por los pasajes consecutivos en confluencia durante al menos 4 a 12 días hasta la fase de replicación amplificación vegetativa de los lanzamientos de ADN de HPV extracromosómicos y en donde el compuesto bajo investigación se aplica al medio de la monocapa de clones celulares en la confluencia y en el que el inhibitor de HPV se prueba para la inhibición de la fase de amplificación vegetativa de la replicación del ADN de HPV.
- 35 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la presencia o ausencia del efecto inhibitor se evalúa midiendo cuantitativa o semicuantitativamente la cantidad de ADN viral extracromosómico.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una secuencia de un gen indicador se inserta en el fragmento subgenómico del ADN de HPV.
- 40 6. El método de la reivindicación 5, en el que la secuencia del gen indicador sustituye los genes L1 y L2 de HPV.
7. El método de la reivindicación 5, en el que el gen informador es d1GFP, luciferasa, fosfatasa alcalina secretada (SEAP) o Gaussia luciferase.
- 45 8. El método de la reivindicación 5, en el que se mide la cantidad de la proteína codificada por el gen indicador.
9. El método de la reivindicación 5, en el que se mide el producto de la reacción catalizada por la proteína codificada por el gen indicador.
- 50 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el HPV es un HPV mucoso de alto riesgo perteneciente al subtipo HPV-18 o HPV-16, o cualquier otro HPV mucoso de alto riesgo.
- 55 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el HPV es un HPV de mucosa de bajo riesgo perteneciente al subtipo HPV-6b o HPV-11, o cualquier otro VPH mucoso de bajo riesgo.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el VPH es un tipo cutáneo de HPV perteneciente al subtipo HPV-5 o HPV-8, o cualquier otro HPV cutáneo.
- 60 13. Un kit para identificar compuestos capaces de inhibir la replicación de HPV en la replicación inicial, el mantenimiento estable o la fase de amplificación vegetativa, comprendiendo dicho kit por lo menos:
- a) la línea celular U20S del osteosarcoma humano que permite la replicación inicial, el mantenimiento estable y las fases vegetativas de amplificación del ciclo de replicación del ADN del VPH;
- 65 b) un constructo que se puede mantener extracromosómicamente con secuencia completa o parcial de ADN de HPV con L1 y L2 sustituidos con genes indicadores para su introducción en la línea celular U20S;
- c) un compuesto o una librería de compuestos a ser rastreados para determinar la actividad anti - VPH;

d) un medio para la evaluación cuantitativa de la actividad replicacional, transcripcional o traslacional del ADN del VPH en las células.

5 14. El kit de la reivindicación 13, en el que el constructo que se puede mantener extracromosómicamente está de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.



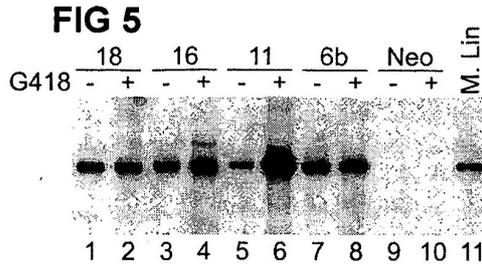


FIG 6

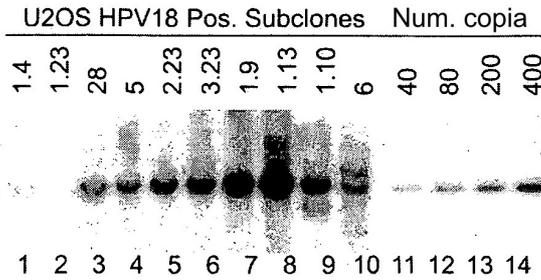


FIG 7

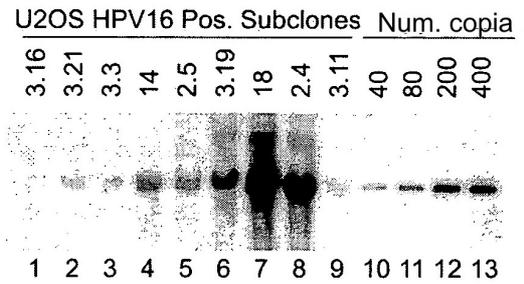


FIG 8

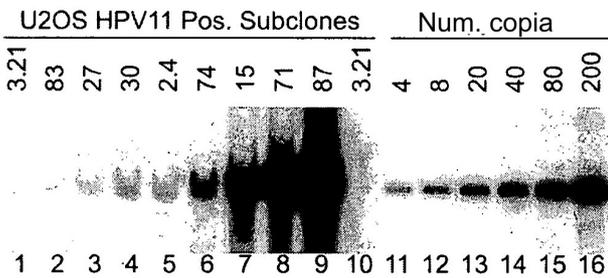


FIG 9

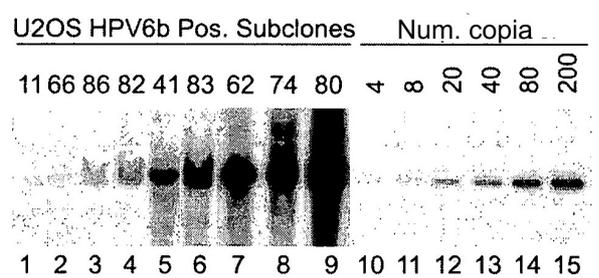


FIG 10

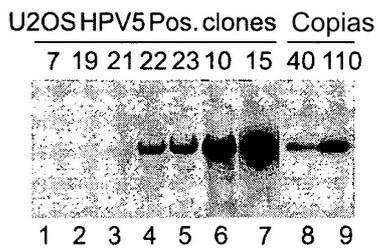


FIG 11

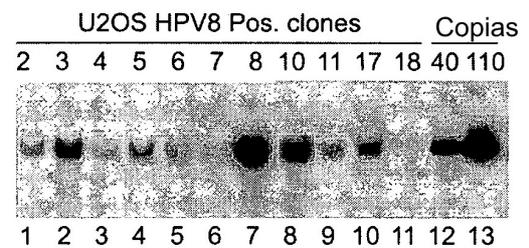


FIG 12

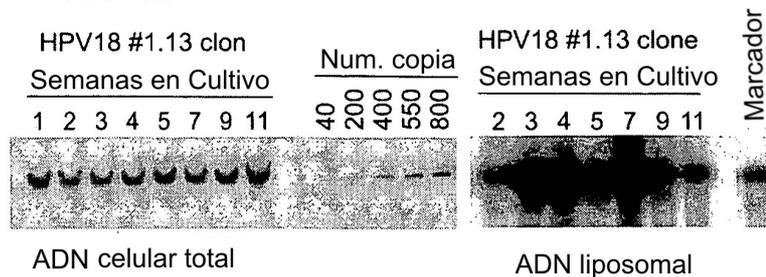


FIG 13

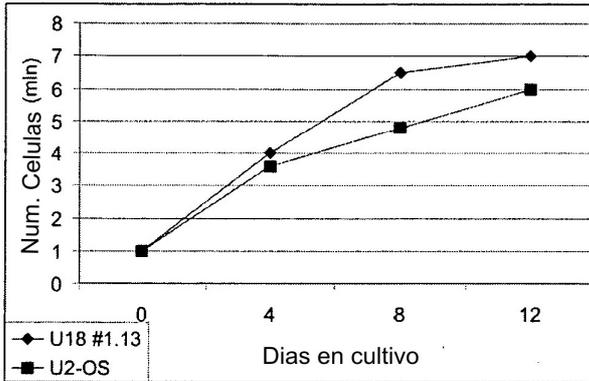


FIG 14

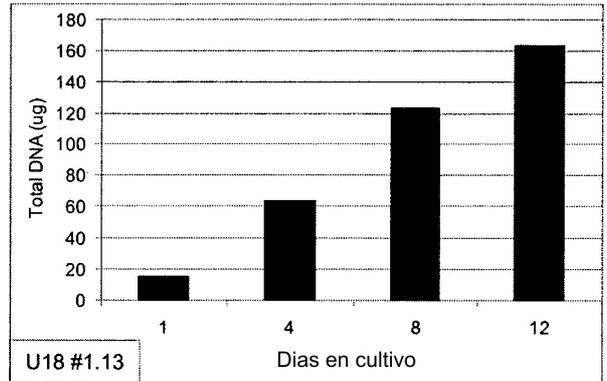


FIG 15

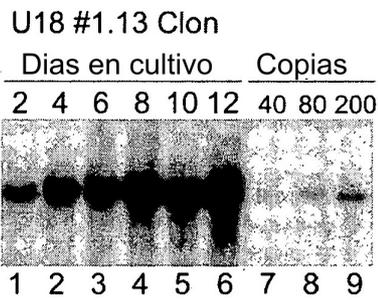


FIG 16

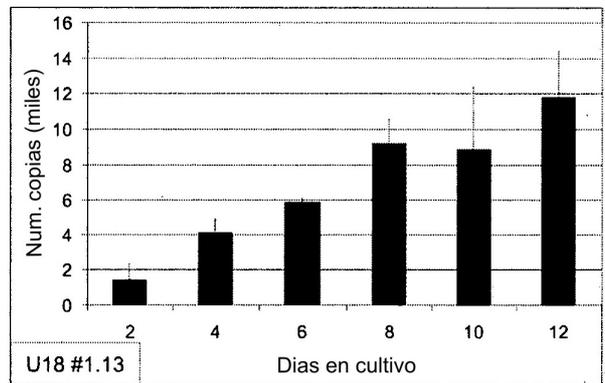


FIG 17

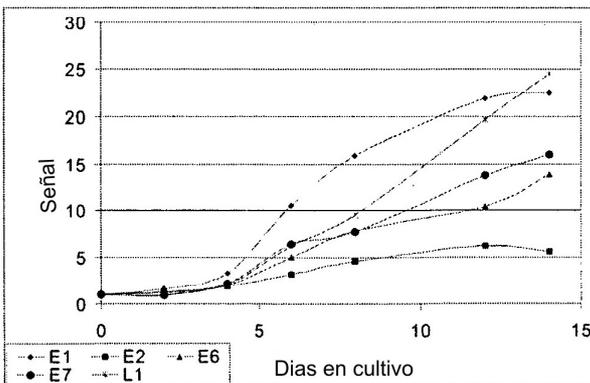
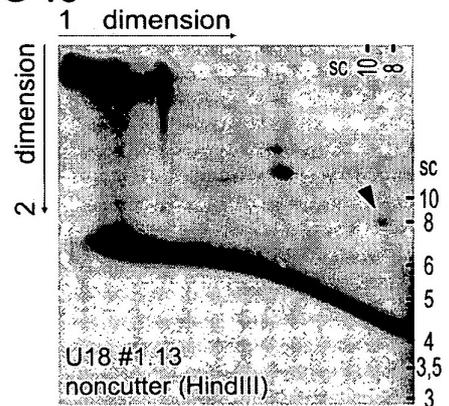
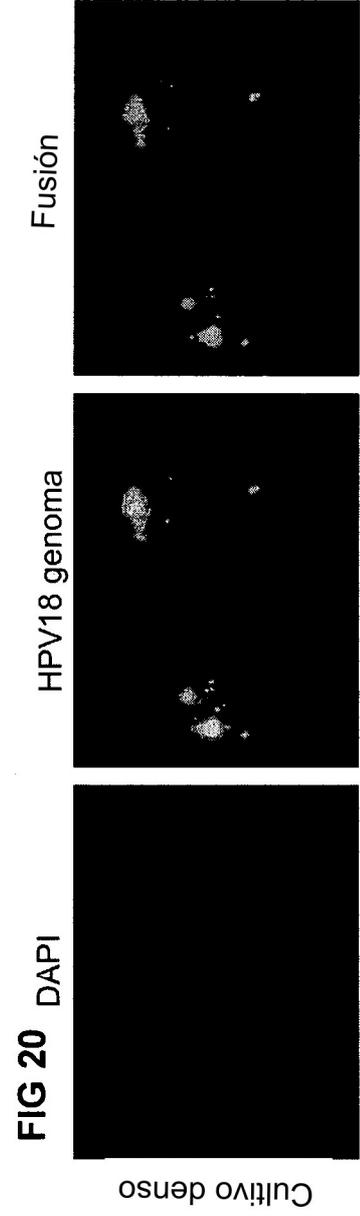
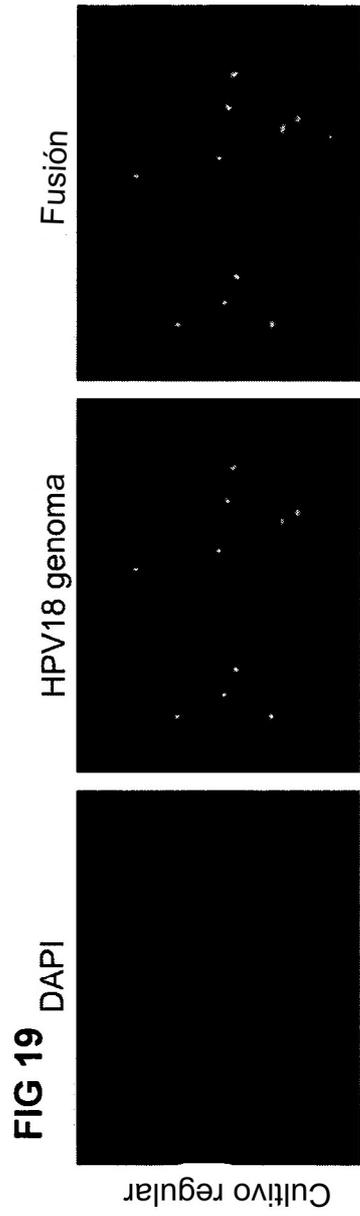


FIG 18





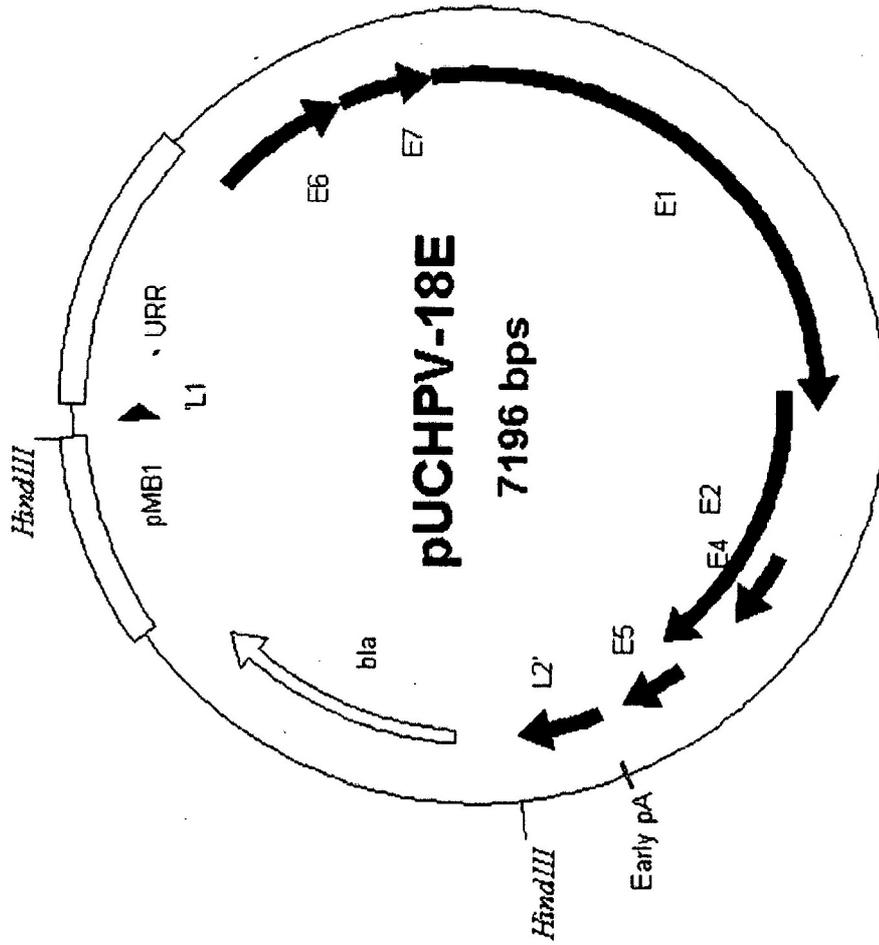


FIG 21

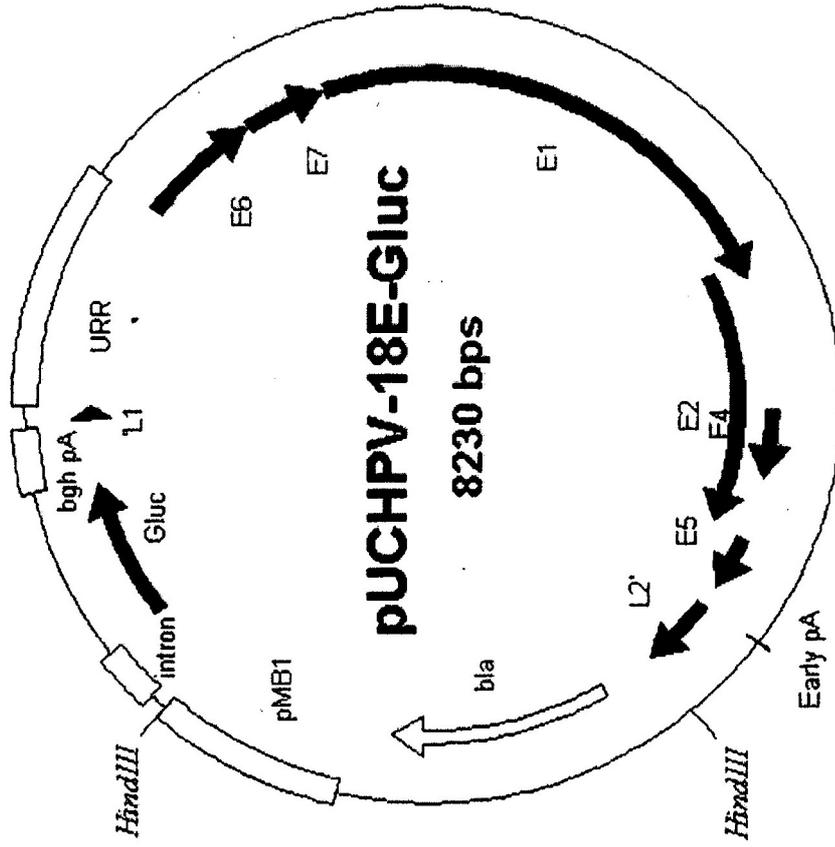


FIG 22

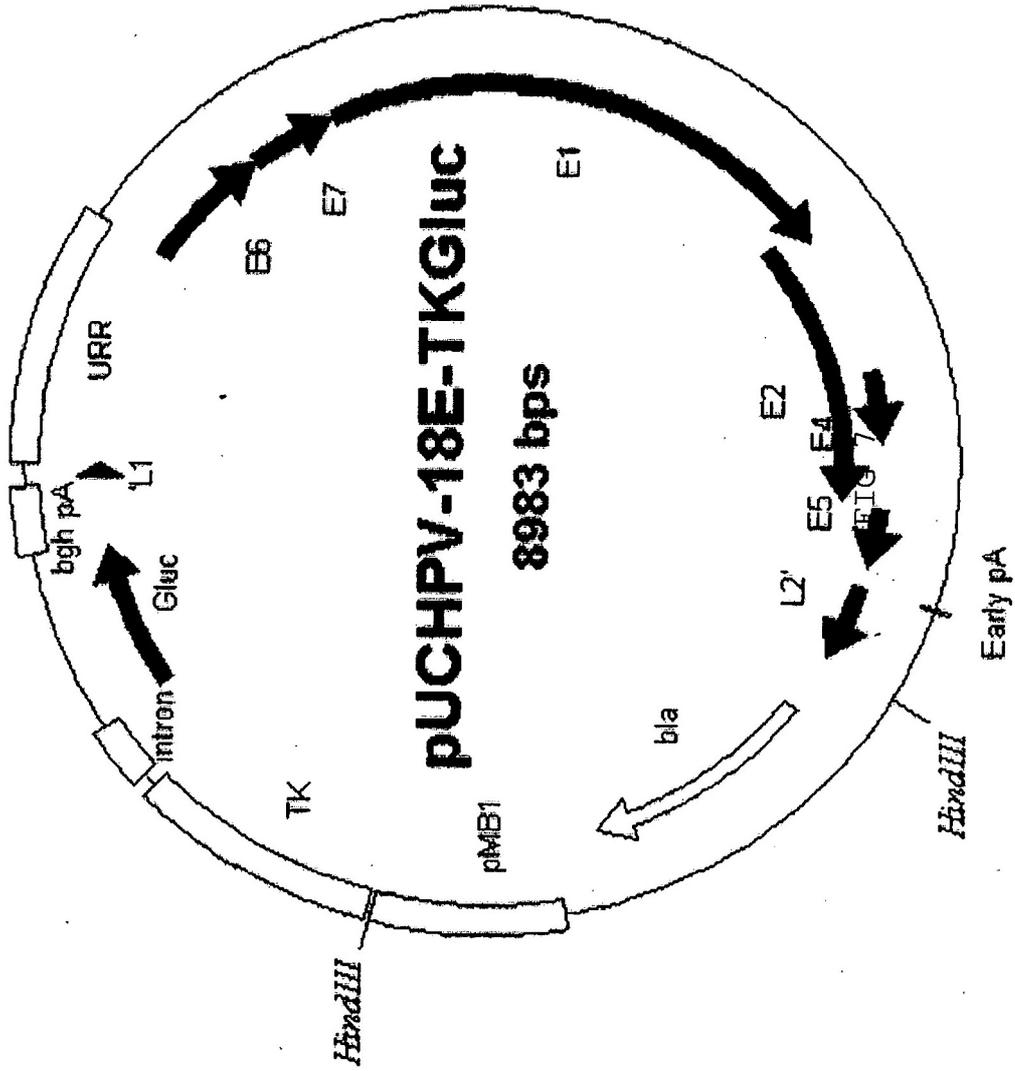


FIG 23