

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 168**

51 Int. Cl.:

C07K 14/115 (2006.01)

C07K 14/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2007 PCT/IB2007/004444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2008 WO08078198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07870468 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2091962**

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

30 Prioridad:

22.12.2006 EP 06292025

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

16.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 686 168 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

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

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

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

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

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

Los inventores han desarrollado previamente un vector utilizando Schwarz MV, la vacuna de sarampión más comúnmente utilizada en el mundo (Combredet y col., 2003). Este vector puede expresar una variedad de genes o combinación de genes grandes para más de 12 pasajes. Se produjeron vectores MV recombinantes que contienen 60 4.000-5.000 nucleótidos adicionales, que representan un 30 % adicional del genoma. Estos virus se produjeron en cultivo celular en títulos comparables con MV convencional. Después de 12 pasajes y un factor amplificador de 10²⁰, más del 96 % de las células infectadas continúan expresando los genes adicionales. Esta expresión notablemente estable, observada también para otros miembros de *Mononegavirales* (Schnell y col., 1996) se debe probablemente a la ausencia de limitaciones geométricas en el tamaño del genoma por estos virus de nucleocápside helicoidal, al contrario de los virus con cápsides icosaédricas. Además, MV infecta células del sistema inmune (macrófagos y células dendríticas), suministrando de esta manera los antígenos de carga directamente a las células presentadoras 65

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

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

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

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

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

55 Durante los últimos 15 años, un extraordinario conjunto de trabajos de varios laboratorios ha permitido el
 establecimiento de diferentes sistemas para rescatar casi todos los virus de ARN de cadena de sentido negativo a
 partir de su ADNc (para revisión ver Conzelmann). A diferencia de los virus con genomas segmentados, los RNP de
 virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada (*Mononegavirales*) están estructurados de manera
 rigurosa y contienen, además de la nucleoproteína (N), el conjunto y la fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P)
 60 y la proteína grande de ARN polimerasa viral (L). El primer *Mononegavirales* infeccioso, el rhabdovirus de la rabia,
 se recuperó a partir de ADNc en 1994 (Schnell y col. 1994). El enfoque implicaba expresión intracelular de proteína
 de virus de rabia N, P y L junto con un ARN de longitud completa cuyo extremo 3' correcto se generó por la ribozima
 del virus delta de hepatitis (HDV). Un transcrito que corresponde al antigenoma viral (cadena de sentido positivo) en
 lugar del genoma (cadena de sentido negativo) se utilizó para evitar un problema de antisentido generado por la
 presencia de las secuencias N, P y L en ARN de longitud completa. En este sistema, las proteínas auxiliares
 65 esenciales se proporcionaron por un vector de vaccinia con capacidad de replicación que codifica la ARN polimerasa
 de fago T7 para dirigir transcripción específica de T7 de plásmidos que codifican las proteínas N, P y L requeridas.

Sistemas similares permitieron la recuperación de virus de rabia infecciosos (Schnell y col., 1994; Ito y col. 001), VSV (Lawson y col.; Whelan y col. 1995) así como el virus *Paramyxoviridae Sendai* (Garcin y col. 1995; Kato y col. 1996; Leyrer y col. 1998; Gujii y col. 2002), HP1V-3 (Hoffman y Banerjee 199) y el virus de sarampión (Takeda y col. 2000; Fujii y col. 2002).

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

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

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

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un método nuevo para generar líneas de células auxiliares capaces de rescatar, de manera reproducible y con gran eficacia, virus de ARN recombinantes de cadena de sentido negativo no segmentada, a partir de ADNc, opcionalmente modificados y sin contaminación de ningún otro virus auxiliar tal como virus vaccinia.
50

Breve descripción de los dibujos

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

60 **Figura 2: transferencia de Western que muestra la expresión de proteínas N y P de MV en diferentes lisados celulares;** (A) 293T no transducida, línea de células 293-3-46 descrita anteriormente en dos diferentes pasajes (17 y 19), poblaciones celulares 293nlsT-NP y 293T7-NP generadas después de transducción con vectores lentivirales; (B) células Vero infectadas con MV, línea de células 293-3-46 en dos diferentes pasajes (17 y 27), ocho clones de células 293T7-NP; (C) células Vero infectadas con MV, línea de células 293-3-46 (pasaje 17), ocho clones de células 283nlsT7-NP, células Vero no infectadas. Las transferencias se sondearon con anticuerpo NP anti-MV (1/500) y anticuerpo secundario anti-Ig de ratón HRP (1/1000).
65

Breve descripción de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos de diversos retrovirus ADN SOLAPADO se definen en diferentes virus: CAEV (SEQ ID NO: 1), EIAV (SEQ ID NO: 2), VISNA (SEQ ID NO: 3), SIV AGN (SEQ ID NO: 4), VIH-2 RID (SEQ ID NO: 5), VIH-1 LAI (SEQ ID NO: 6) y VIH-1 (SEQ ID NO: 7). Las secuencias de nucleótidos de la ARN polimerasa de T7, la ARN polimerasa de nls T7 y las proteínas N, P y L del virus MV se definen respectivamente en SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14 y 16 así como sus respectivas secuencias de proteína correspondientes en SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15 y 17. La secuencia de nucleótidos completa del plásmido pTM-MVSchw (CNCM I-2889) se define en la SEQ ID NO: 18. La secuencia de nucleótidos completa del plásmido pEMC-LSchw (CNCM I-3881) se define en la SEQ ID NO: 19.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a una célula recombinante que comprende, integrados en su genoma, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos, y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con dicho ácido o ácidos nucleicos y donde dicha ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), dichas proteínas N y P se expresan de una manera estable, y donde dichos derivados funcionales de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) y/o la nucleoproteína (N) y/o la fosfoproteína (P) se definen como variantes de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) y/o de la proteína N y/o de la proteína P que mantienen actividad de la proteína a partir de la cual se obtienen, como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP), funcional en transcripción y replicación en un genoma de virus, en un sistema de rescate que posibilita la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada a partir de ADNc clonado, estando dichas variantes codificadas por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad (solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación del 50 % de formamida, 6X SSC a 42° C y condiciones de lavado a 68° C, 0,2X SSC y el 0,1 % de SDS) con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 y la proteína P de SEQ ID NO: 15 de una cepa o virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada;

b) un ácido nucleico que presenta al menos el 80 %, preferentemente el 90 %, más preferentemente el 95 % o incluso el 99 % de similitud con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 o la proteína P de SEQ ID NO: 15, calculándose dicha similitud a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias; y

c) un ácido nucleico que difiere del ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 o la proteína P de SEQ ID NO: 15 en al menos un nucleótido, opcionalmente sustitución conservativa, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, en al menos una supresión o adición de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 supresiones o adiciones de nucleótido;

o siendo un fragmento que representa al menos el 70 %, particularmente el 80 % y más particularmente el 90 % o incluso el 95 % de la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 o la proteína P de SEQ ID NO: 15.

Las células de la presente invención son células recombinantes, lo que significa que estas células son el resultado de manipulación genética *in vitro* intencional que da como resultado recombinación de secuencias genómicas de las células con secuencias heterólogas, es decir, secuencias que se originan de una célula o un organismo diferente. Partiendo de células aisladas, se preparan células recombinantes que tienen características genéticas y/o fenotípicas diferentes de las células de partida y también proporcionan la expresión o producción estable de al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P de uno o varios virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Las células de la invención se reivindican como producto, externo al cuerpo de un ser humano.

La expresión "*producir de forma estable*" significa que las células expresan o producen al menos la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P en un número de divisiones de célula iguales a o superiores a aproximadamente 65, provechosamente durante el tiempo que las células sobreviven. De acuerdo con una realización particular de la invención, las células recombinantes expresan o producen las al menos tres proteínas, es decir al menos la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P, continuamente en el tiempo. De acuerdo con una realización particular de la invención, la integridad, es decir, la secuencia de aminoácidos primaria, de estas tres proteínas se mantiene, asegurando que las proteínas expresadas o producidas sean siempre las mismas.

La producción estable de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P es independiente de la presencia en la célula, de plásmido o plásmidos que portan la secuencia codificante de estas proteínas. Por lo tanto, aunque los plásmidos pueden utilizarse en un paso particular de manipulación de células *in vitro* o *ex vivo*, las células recombinantes resultantes, que producen de forma estable las tres o las al menos tres proteínas, no contienen más plásmidos. De esta manera, la expresión se dice que es independiente de plásmido, al contrario de las células recombinantes en las cuales la expresión de proteína se dirige por plásmido o plásmidos.

En una realización particular de la invención, la expresión estable de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), de la proteína N y de la proteína P, no requieren la presencia de un fármaco, tal como un antibiótico, es decir, la expresión estable no requiere una presión de selección. Por lo tanto, la producción estable no requiere la presencia obligatoria de plásmido o plásmidos para supervivencia, dicho plásmido tiene la secuencia codificante de la proteína o proteínas que se tienen que expresar.

Otra característica de la invención es que cada una de las tres proteínas, es decir, al menos la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P se producen o expresan a nivel similar a lo largo del tiempo. “*Nivel similar*” como se usa en el presente documento significa que la expresión de cada una de las tres proteínas es constante durante la vida de la célula, incluso después de la división de la célula, con una variación en el nivel de expresión que no es más de aproximadamente el 30 %, particularmente no mayor de aproximadamente el 20 % y preferentemente no mayor de aproximadamente el 10 %, en comparación con la expresión media calculada en diferentes momentos de la vida de la célula.

La ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) expresada o producida por las células de la invención es cualquier polimerasa adecuada para sintetizar ARN viral monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada (ARNv) obtenida a partir de un clon de ADNc en un sistema de rescate. La naturaleza de la polimerasa depende esencialmente de la naturaleza de la secuencia de polimerasa de promotor de ARN ubicada en el clon de ADNc del virus de ARN monocatenario de cadena de sentido negativo no segmentada, utilizado para el sistema de rescate (también denominado genética inversa o síntesis *de novo* de virus de ARN de cadena de sentido negativo a partir de ADNc clonado).

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

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

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

Familia	Subfamilia	Género	Especies	Abreviatura
		<i>Vesiculovirus</i>	<i>Virus de estomatitis vesicular</i>	VSV
		<i>Lyssavirus</i>	<i>Virus de rabia</i>	RV
			<i>Virus de sarampión</i>	MV
			<i>Virus de la peste bovina</i>	RPV
			<i>Virus de moquillo canino</i>	CDV
			<i>Virus Sendai</i>	SeV
			<i>Virus de parainfluenza humana tipo 3</i>	hPIV3
			<i>Virus de parainfluenza bovina tipo 3</i>	bPIV3
			<i>Virus de simio de tipo 5</i>	SV5
			<i>Virus de parotiditis</i>	
			<i>Virus de parainfluenza humana tipo 2</i>	hPIV2
			<i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i>	NDV
			<i>Virus sincitial respiratorio humano</i>	hRSV
			<i>Virus sincitial respiratorio bovino</i>	bRSV
<i>Filoviridae</i>	/	Virus parecidos a Ébola	<i>Virus Ébola</i>	/

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

Cada vez que se hace referencia en la presente solicitud, a un virus de ARN de cadena negativa no segmentada, posiblemente se aplique en particular a los virus específicos listados en el presente documento y, especialmente, a un virus del sarampión, en particular a la cepa Schwarz.

La expresión “*derivados funcionales de los mismos*” se refiere a cualquier variante funcional incluyendo fragmentos de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) y/o la proteína N y/o la proteína P, siempre que los derivados funcionales mantengan la actividad de la proteína a partir de la cual se obtienen, al menos como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP), funcional en transcripción y replicación en un genoma de virus, en un sistema de rescate que posibilita la producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada a partir de ADNc clonado.

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

- el ácido nucleico que codifica la variante funcional se hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre (referencia) o su forma nuclear (nlsT7) o con la proteína N y la proteína P de una cepa o virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada identificado. Las condiciones de rigurosidad elevada se definen por Sambrook y col. en *Molecular Cloning: un manual de laboratorio* (1989). Estas condiciones de rigurosidad elevada abarcan: uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8.0), condiciones de hibridación de formamida al 50 %, 6X SSC a 42° C y condiciones de lavado de 68° C, 0,2X SSC y SDS al 0,1 %. Los protocolos se conocen por los que tienen conocimientos ordinarios en la técnica. Además, los expertos en la materia reconocerán que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado pueden ajustarse según sea necesario de acuerdo con las limitaciones experimentales;
- el ácido nucleico que codifica la variante funcional presenta al menos el 80 %, preferentemente el 90 %, más preferentemente el 95 % o incluso el 99 % de similitud con un ácido nucleico nativo que codifica la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N o la proteína P, calculándose la similitud a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias;
- el ácido nucleico que codifica la variante funcional difiere del ácido nucleico nativo que codifica la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N o la proteína P en al menos una sustitución de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, opcionalmente sustituciones conservativas (sustituciones de nucleótido que no alteran la secuencia de aminoácidos), en al menos una supresión o adición de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 supresiones o adiciones de nucleótido o nucleótidos.

Un fragmento se define en la presente solicitud como una parte de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) de longitud completa, de la proteína N o de la proteína P, siempre y cuando el fragmento tenga la misma actividad que la proteína completa a partir de la cual se obtiene, al menos como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP) como se describe en el presente documento. En una realización particular, el fragmento representa al menos el 70 %, particularmente el 80 % y más particularmente el 90 o incluso el 95 % de la proteína de longitud completa.

Por consiguiente, cuando se hace referencia a la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), las proteínas N o P o a sus secuencias codificantes, la descripción se aplica de forma similar a sus derivados funcionales como se define en el presente documento.

Una célula recombinante de la invención comprende, integrada en su genoma, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Opcionalmente, los ácidos nucleicos que codifican las tres proteínas anteriores están, cada uno o al menos uno de los mismos, bajo el control de elemento o elementos reguladores de la transcripción. La expresión “integrado en el genoma” significa que la al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control de elemento o elementos reguladores de la transcripción está ubicada dentro del genoma de las células recombinantes, en condiciones que permiten que las células expresen de forma estable la proteína codificada por el ácido nucleico. En una realización particular, la célula recombinante de la invención comprende además, integrada en su genoma, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

“Al menos una copia” significa que el ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) y/o la proteína N y/o la proteína P y/o la proteína L puede estar presente en una o varias copias, preferentemente exactamente o al menos en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 copias o más, dependiendo del nivel de expresión necesario para cada una de estas proteínas.

5 Las células de la invención también contienen al menos una copia de ADN solapado integrada en el genoma celular. Un ADN solapado es una secuencia de nucleótidos de origen retroviral, especialmente lentiviral o similar a retroviral que comprende dos regiones esenciales, es decir, el TPPc (tracto de polipurina central) y la CTS (región de terminación de acción en cis), en donde las regiones TPPc y CTS inducen una estructura de ADN de tres cadenas durante la replicación del ADN que las contiene (previamente definido en Zennou y col., 2000; y en las solicitudes WO99/55892 y WO02/27300). En una realización particular, el ADN solapado se inserta inmediatamente cadena arriba del promotor interno que posibilita la transcripción de los ácidos nucleicos que codifican la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N, la proteína P y posiblemente la proteína L. El ADN solapado (TPPc-CTS) se inserta en los vectores derivados de retrovirus de la invención en una orientación funcional, es decir, la región TPPc está en 5' con respecto a la región CTS (correspondiendo la parte 5' del vector al LTR que contiene el sitio de unión a cebador (PBS) y correspondiendo la parte 3' del vector a la región que contiene el 3'TPP).

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

El ADN solapado preferido comprende o consiste en las secuencias como se define en SEQ ID NO: 1 a 7. Se debe de mencionar que el ADN solapado se utiliza aislado de su contexto de nucleótido natural (genoma viral), es decir aislado del gen *pol* en el cual está contenido naturalmente en un lentivirus. Por lo tanto, el ADN solapado se utiliza, en la presente invención, con las partes 5' y 3' que no son necesarias del gen *pol* suprimidas y se recombina con secuencias de diferentes orígenes. De acuerdo con una realización particular, un ADN solapado tiene una secuencia de nucleótidos de aproximadamente 90 a aproximadamente 150 nucleótidos, en particular de aproximadamente 100 a aproximadamente 140 nucleótidos.

La invención también se refiere a una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con (1) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), (2) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y (3) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican a estas células.

La invención también se refiere a una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con (1) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), (2) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, (3) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y (4) un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican a estas células.

La invención abarca una célula que se puede obtener por recombinación de su genoma con un vector de expresión que comprende al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y un ADN solapado. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican a estas células. En una realización particular, el vector de expresión comprende además al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

La invención también se dirige a un vector de expresión derivado de retroviral que comprende un ADN solapado como se ha descrito anteriormente y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína que se selecciona entre el grupo que consiste en una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido

negativo no segmentada y una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

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

Un vector derivado de retroviral y particularmente un vector derivado de lentiviral y más particular un vector derivado de VIH-1, es un genoma viral que comprende los elementos necesarios para la retrotranscripción, particularmente las LTR posiblemente mutadas que incluyen supresión en parte especialmente supresión en la región U3, como se ilustra a continuación y provechosamente el ADN solapado. Estas regiones de LTR y ADN solapado pueden ser las únicas secuencias de origen retroviral, especialmente lentiviral en el vector de expresión derivado de retroviral. En ningún caso, el vector derivado de retroviral contiene las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas retrovirales de longitud completa. En una realización particular de la invención, el vector derivado de retroviral comprende o consiste en un ADN solapado y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína necesaria para el rescate de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada como se describe en el presente documento, así como las LTR del genoma viral correspondiente.

Un vector de expresión de la invención comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) o parte funcional de la misma. Un vector de este tipo puede ser el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-T7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3702, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa de fago T7, especialmente una que tiene la secuencia SEQ ID NO: 8, o el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-nlsT7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3703, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la forma nuclear de la ARN polimerasa de fago T7, especialmente una que tiene la secuencia SEQ ID NO: 10.

Un vector de expresión de la invención comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Un vector de este tipo puede ser el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-N depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3700, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la proteína N de MV Schwarz, especialmente una que tiene la secuencia SEQ ID NO: 12.

Un vector de expresión de la invención comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. Un vector de este tipo puede ser el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-P depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3701, el cual es un vector de expresión de VIH-1 que comprende un ADN solapado (TRIP), una LTR suprimida en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor CMV y un ácido nucleico que codifica la proteína P de MV Schwarz, especialmente una que tiene la secuencia SEQ ID NO: 14.

Otro vector de expresión de la invención comprende un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena negativa no segmentada. Dicho vector puede ser el plásmido pEMC-LSchw, depositado en el CNCM el 18 de diciembre de 2007, bajo el número I-3881. Un ácido nucleico particular que codifica una proteína L es el uno que tiene SEQ ID NO: 19.

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

La divulgación describe cada uno y cualquier fragmento de nucleótido contenido en los polinucleótidos insertados en los plásmidos depositados a los que se hace referencia en el presente documento y especialmente cada una y cualquier región adecuada para diseñar el inserto, de acuerdo con la presente divulgación. La divulgación también describe el uso de estos fragmentos para la construcción de plásmidos de la invención.

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

puede ser cualquier ADN solapado y el vector de expresión de VIH-1 puede ser cualquier vector y particularmente cualquier vector viral.

5 Otros vectores de expresión de la invención comprenden un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN cadena de sentido negativo no segmentada o comprenden un ADN solapado y ácido o ácidos nucleicos que codifican una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y opcionalmente una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

10 El término “vector de expresión” indica que, además de los elementos mencionados explícitamente, el vector comprende todos los elementos necesarios para dirigir la expresión del ácido o ácidos nucleicos que codifican las proteínas de interés (elementos reguladores de la expresión) y particularmente elementos reguladores de transcripción. “Elemento regulador de transcripción” define cualquier región de ADN implicada en la regulación de transcripción del ácido o ácidos nucleicos integrados en el genoma, e incluye un promotor, tal como CMV, EF1alfa o mPGK (fosfoglicerato quinasa murina) o más generalmente cualquier promotor adecuado para la inserción en un vector retroviral, especialmente un vector lentiviral, potenciador o elementos reguladores de acción en cis. Estos elementos y particularmente el promotor se eligen dependiendo de la naturaleza de las células recombinantes. La determinación del promotor adecuado, de acuerdo con el nivel de expresión buscado o con la célula recombinada, es parte del conocimiento del experto en la materia. Se ha de mencionar que, cuando la célula recombinante contiene varios ácidos nucleicos heterólogos (también polinucleótidos designados) que codifican las proteínas de interés, dichos elemento o elementos reguladores de transcripción pueden ser únicos para todos los ácidos nucleicos o compartidos por alguno de ellos o por el contrario cada ácido nucleico puede estar asociado con un elemento regulador de transcripción. En el último caso, los elementos reguladores de transcripción pueden ser similares o diferentes.

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

45 A continuación de la recombinación por el vector o vectores que contienen un ADN solapado y ácido o ácidos nucleicos que codifican las al menos tres proteínas de interés y la integración de estos ácidos nucleicos en el genoma, las células recombinantes producen de manera estable la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P.

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

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

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

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

20 En una realización adicional de la invención, las células recombinantes de la invención se recombinan adicionalmente por un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. La expresión de la proteína L puede ser temporal y dirigida por un plásmido que no contiene un ADN solapado o al contrario puede ser estable y dirigida por un vector que contiene un ADN solapado como se ha definido anteriormente. La recombinación por un plásmido o vector que porta la al menos una copia del ácido nucleico que codifica la proteína L puede ser simultánea o posterior a la recombinación por el vector o vectores que contienen la secuencia o secuencias codificantes de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P.

30 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una célula recombinante de la invención que comprende también integrada en su genoma al menos una copia de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

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

40 En una realización particular, la proteína L es de un virus *Paramyxoviridae*, preferentemente un virus *Paramyxovirinae* y más preferentemente un virus *Morbillivirus*. Un ejemplo de *Morbillivirus* es el virus de Sarampión (MV), en particular una cepa no inmunosupresora atenuada, por ejemplo una cepa aprobada para una vacuna y especialmente la cepa Schwarz MV o incluso la cepa Edmonston (Ed). Una proteína L particular es la del virus MV (SEQ ID NO: 16) o la una codificada por la secuencia insertada en el plásmido pEMC-LSchw y especialmente la secuencia encontrada entre los nucleótidos 1425 y 7976 de SEQ ID NO: 19.

50 En una realización particular, la secuencia de la proteína L no debe estar modificada con relación a la proteína L de tipo silvestre y debe ser funcional, es decir permitir la producción de partículas o virus cuando se transclementa con las proteínas N y P y una polimerasa de T7 en una célula hospedadora. Una prueba para determinar la funcionalidad eficaz de un clon que porta la proteína L se lleva a cabo por transfección de una célula competente con vector o vectores que codifican la proteína N, la proteína P y polimerasa de T7 (o nlsT7), un vector que codifica la proteína L que se tiene que ensayar y un minigenoma que comprende un líder, un promotor, un gen informador (tal como GFP) y un remolque. La funcionalidad del clon L se revela por la producción de partículas que expresan el gen informador.

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

65

Los ácidos nucleicos purificados, incluyendo el ADN o plásmidos están dentro del significado de ADNc de acuerdo con la invención, siempre que el ácido nucleico especialmente ADN cumpla con las definiciones definidas anteriormente.

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

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

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

25 La invención también se refiere a cultivos de células en donde dichas células son las que se definen en las reivindicaciones y particularmente cultivos de células que producen de manera estable una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de las mismas como se define en la reivindicación 1. En otra realización, la invención también se refiere a cultivos de células que producen de manera estable una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de las mismas como se define en la reivindicación 1 y que producen, de manera estable o transitoria una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

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

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

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

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

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

- 60 a. recombinación adicional del genoma de una célula recombinante o cultivo de células como se define en las reivindicaciones, con un clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
- b. recuperación del virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de la célula recombinante o cultivo de células recombinantes.

65

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

En estos métodos, la célula recombinante o un cultivo de células recombinantes que producen de manera estable una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es una célula como se define en las reivindicaciones o un cultivo de células como se define en las reivindicaciones, es decir, son células recombinantes en la medida en que se han modificado mediante la introducción de uno o más polinucleótidos como se ha definido anteriormente. En una realización particular de la invención, la célula o cultivo de células, que producen de manera estable la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), las proteínas N y P, no producen la proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o no producen de manera estable la proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, por ejemplo, que posibilita la expresión o producción transitoria.

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

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

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

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

- producir de manera estable una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada como se define en las reivindicaciones, y
- a partir de los cuales se pueden recuperar de manera eficaz los virus infecciosos recombinantes, sin contaminaciones por virus no deseados y/u otros tipos de células.

La “*recuperación de virus recombinantes infecciosos*” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier medio, por el cual los virus infecciosos, producidos por las células, se liberan a partir de las células y se aíslan a

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

En métodos particulares de la invención, la etapa de recombinación no comprende las etapas de recombinación de una célula o un cultivo de células que producen de manera estable una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína de co-factor de polimerasa (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada como se define en la reivindicación 1, con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada. En este caso, las células recombinantes de la invención se han seleccionado por su capacidad de expresar la proteína L y especialmente se han recombinado previamente con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L), integrándose el ácido nucleico que codifica la proteína L en el genoma de célula o no.

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

La estabilidad de la producción de ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), la proteína N y la proteína P en las células recombinantes de la invención tiene algunas ventajas de acuerdo con los métodos anteriormente descritos en la técnica:

- el método de la invención no necesariamente comprende una etapa de transferencia;
- el método no comprende la etapa de choque de calor como se informa en Parks y col. (1999). De hecho, se ha demostrado que esta etapa mejora la eficacia de la síntesis de las proteínas N o P virales, así como ARN polimerasa, proteínas que son sintetizadas a partir de ácidos nucleicos portados por plásmidos. En la presente invención, sin embargo, los ácidos nucleicos se integran en el genoma celular y se ha demostrado que la expresión de estas proteínas es estable, y/o a un nivel adecuado para iniciar la encapsidación *de novo*.
- el método produce grandes cantidades de virus infecciosos, puesto que la producción de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), proteína N y proteína P es estable y no depende de su expresión a partir de los plásmidos. Por lo tanto, aproximadamente 100-400 de 10^6 células recombinadas transmiten virus infecciosos después de la recombinación (número de acontecimientos de rescate). Esto es mucho mayor a 1-6 de 10^6 células transfectadas obtenidas con el método de Radecke y col (1995). En una realización particular del método, el número de acontecimientos de rescate, para 10^6 células recombinadas es más de 20, más de 50, más de 100, más de 200, más de 300, más de 400 o más de 500.

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

De acuerdo con la invención, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus MV, en particular un virus atenuado en particular una cepa no inmunosupresora atenuada, por ejemplo, una cepa aprobada para una vacuna, tal como la cepa Schwarz MV. Un clon de ADNc es una secuencia de ADN que codifica el antigenoma de longitud completa de un virus de ARN de cadena negativa no segmentada.

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

Como alternativa, el clon de ADNc de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada se obtiene a partir de cualquier virus de la Tabla I. Un virus de sarampión recombinante particular a partir del cual se obtiene un

clon de ADNc es la cepa Schwarz y especialmente una cepa Schwarz de vacuna aprobada, tal como la producida bajo la marca Rouvax, disponible de Aventis Pasteur (Francia).

5 Una “*cepa atenuada*” se define en el presente documento como una cepa que no es virulenta o menos virulenta que la cepa parental en el mismo hospedador, manteniendo la inmunogenicidad y posiblemente la adyuvantividad cuando se administra en un hospedador, es decir, preservando los epítomos de linfocitos T y B inmunodominantes y posiblemente la adyuvantividad tal como la inducción de proteínas coestimuladoras de linfocitos B o la citocina IL-12. En una realización particular, la cepa atenuada es una “*cepa vacuna aprobada*”, es decir, una cepa certificada para su uso en la producción de vacunas por una autoridad de la salud nacional o regional que tiene garantizada una aprobación de mercado para este producto (designación legal). En consecuencia, una “*cepa vacuna aprobada*” se ha demostrado ser segura, estable y capaz de proporcionar protección eficaz (inmunogenicidad y adyuvantividad). La estabilidad de una cepa se mide evaluando que las propiedades de la cepa se mantengan sustancialmente sin cambios tras numerosos pasajes en la misma línea celular certificada.

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

25 En una realización preferida, se señala que el clon de ADNc obtenido, que consiste o que comprende uno o varios ácido o ácidos nucleicos heterólogos, cumple con la denominada regla de 6. Por lo tanto, el clon de ADNc obtenido es de longitud polihexamérica, es decir múltiplo de seis. Este requisito se logra especialmente para clones de ADNc derivados de *Paramyxoviridae*, en particular virus del sarampión. Algunos virus de ARN de cadena negativa no segmentada no cumplen esta regla, como se sabe a partir de la persona experta en la materia.

30 Cualquier ácido nucleico heterólogo se puede insertar en la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc, siempre y cuando la inserción no evite la producción de virus de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso (sitios permisivos). En una realización particular, la inserción o eliminación del genoma viral nativo proporciona un polinucleótido el cual es un múltiplo de seis. De esta manera, aún si la longitud del genoma no es un múltiplo de seis, la modificación consiste en seis o un múltiplo de seis supresiones y/o inserciones.

Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico heterólogo pueden codificar uno o varios péptidos capaces de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular (tal como la respuesta CTL o CD4) en un huésped determinado, frente al organismo u organismos especialmente los organismos patógenos, por ejemplo el virus, especialmente retrovirus, flavivirus o coronavirus, de la bacteria o parásitos a partir de los cuales se originan. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de este péptido es una que comprende al menos un epítomo de un antígeno, especialmente un epítomo conservado, epítomo que está expuesto de forma natural en un antígeno o se obtiene o está expuesto como resultado de una mutación o modificación o combinación de antígenos. Los ácidos nucleicos heterólogos, que pueden insertarse en los clones de ADNc, codifican especialmente antígenos estructurales (incluyendo fragmentos antigénicos de los mismos o derivados de dichos antígenos o fragmentos) de virus que incluyen retrovirus tales como retrovirus humanos especialmente lentivirus, en particular VIH-1 o VIH-2, flavivirus o envuelta de coronavirus, tal como un antígeno de envuelta o cápside. Particularmente, tales antígenos son especialmente de envueltas de virus de SIDA que incluyen VIH-1 o VIH-2, de la cápside de VIH o de envueltas del Virus de la Fiebre Amarilla o envueltas del Virus del Nilo Occidental o de envueltas del virus de Dengue (DV), envueltas del virus de encefalitis japonesa (JEV) o envuelta del coronavirus asociado con SARS. Sin embargo, otros antígenos retrovirales, flavivirales o de coronavirus se pueden utilizar de forma provechosa, con el fin de obtener virus de sarampión recombinantes capaces de provocar anticuerpos frente a dichos retrovirus o flavivirus, y/o capaces de provocar la producción de anticuerpos neutralizados frente a retrovirus o flavivirus. En otra realización, el péptido codificado o incluido por las secuencias de ácido nucleico es antígeno tumoral o un antígeno expresado específicamente en la superficie de célula de las células de cáncer. De acuerdo con otra realización de la invención, las secuencias codifican multiépítomos o antígenos que como alternativa o adicionalmente provocan una respuesta inmune celular frente a retrovirus o flavivirus.

60 Provechosamente, los virus de sarampión recombinantes producidos por el método de la invención pueden también provocar una respuesta inmune humoral y/o celular frente a virus de sarampión. Sin embargo esta respuesta es no obligatoria siempre que se obtenga, de hecho, la respuesta inmune frente al epítomo o multiépítomos o antígenos descritos anteriormente.

65 En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína a partir de un retrovirus de VIH, particularmente un antígeno de envuelta de VIH y especialmente un péptido derivado de una proteína o glicoproteína de envuelta de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de interés a este respecto son especialmente

gp160, gp120 y gp41 de VIH-1 o gp140, GAG o TAT de VIH-1. En una realización particular de la invención, la secuencia de aminoácidos heteróloga se obtiene a partir de un gp160, gp120 de VIH-1 o gp140, GAG o TAT de VIH-1 recombinantes.

- 5 En otra realización, los bucles V1, V2 y/o V3 del antígeno gp120 (o gp160) se suprimen o se suprimen parcialmente, individualmente o en combinación de manera que los epítomos conservados se exponen en el antígeno gp120 recombinante obtenido. Los bucles V1, V2 y V3 del antígeno gp120 (o gp160) de VIH-1 se han descrito especialmente en Fields virology (Fields B.N. y col. Lippincott Raven publishers 1996, págs. 1953-1977).
- 10 En otra realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que se obtiene a partir del antígeno gp120 (o gp160) de VIH-1, en donde los bucles V1, V2 y/o V3 del antígeno gp120 (o gp160) se sustituyen o se sustituyen en parte, individualmente o en combinación, de manera que los epítomos conservados se exponen en el antígeno gp120 (o gp160) recombinante obtenido.
- 15 En otra realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que se obtiene a partir de un antígeno de envuelta de VIH-1, especialmente se obtiene a partir del antígeno gp120 de manera que los bucles V1 y V2 se suprimen y el bucle V3 se sustituye por la secuencia AAELDKWASAA.

20 En otra realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un péptido que es gp160ΔV3, gp160ΔV1V2, gp160ΔV1V2V3, gp140ΔV3, gp140ΔV1V2, gp140ΔV1V2V3.

Los clones de ADNc preferidos que contienen epítomos de VIH, WNV, YFV, DV o JEV son vectores definidos en la Tabla II depositados en el CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos – Institut Pasteur-París, Francia) y cuyas características se proporcionan a continuación.

25

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

I-2883 (pMV2(EdB)gp160[delta]V3HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen del gp160ΔV3+ELDKWAS de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21264 nt.

30

- 5 I-2884 (pMV2(EdB)gp160HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen de gp160 de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21658 nt.
- 10 I-2885 (pMV2(EdB)gp140HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen de gp140 de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21094 nt.
- 15 I-2886 (pMV3(EdB)gp140[delta]V3HIV89.6P) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen de gp140 Δ V3(ELDKWAS) de la cepa 89.6P del virus SVIH insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 21058 nt.
- 20 I-2887 (pMV2(EdB)-NS1YFV17D) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen NS1 del virus de fiebre amarilla (YFV 17D) insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 20163 nt.
- 25 I-2888 (pMV2(EdB)-EnvYFV17D) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus de sarampión (cepa B Edmonston), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que contiene el gen Env del virus de la fiebre amarilla (YFV 17D) insertado en un ATU en posición 2 (entre los genes N y P del virus de sarampión). El tamaño del plásmido es 20505 nucleótidos.
- 30 I-3033 (pTM-MVSW2-Es(WNV)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen de la envuelta secretada, (E) del virus del Nilo Occidental (WNV), insertado en un ATU.
- 35 I-3034 (pTM-MVSW2-GFPbis) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del GFP insertado en un ATU.
- 40 I-3035 (pTM-MVSW2-p17p24[delta]myr(HIVB)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del gen gag que codifica proteínas p17p24 Δ myr del virus HIVB insertado en un ATU.
- 45 I-3036 (pTMVSW3-Tat(HIV89-6p)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del gen Tat de la cepa del virus 89.6P insertado en un ATU.
- 50 I-3037 (pTM-MVSW3-GFP) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen del gen GFP insertado en un ATU que tiene una supresión de un nucleótido.
- 55 I-3038 (pTM-MVSW2-Es) (YFV) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen de la proteína secretada del virus de Fiebre Amarilla (YFV) insertado en un ATU.
- 60 I-3054 (pTM-MVSW2-gp140 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp140 [delta] V1 V2 (HIV 89-6) insertado en un ATU.
- 65 I-3055 (pTM-MVSW2-gp140 [delta] V3 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp140[delta]V3(HIV89-6) insertado en un ATU.
- I-3056 (pTM-MVSW2-gp160 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)) es un plásmido obtenido de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de ARN polimerasa de T7 y que expresa el gen que codifica gp160[delta]V1 V2 V3(HIV89-6) insertado en un ATU.

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

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

10 I-3440 (pTM-MVSchw2-[EDIII+M¹⁻⁴⁰]WNV (IS-98-ST1)) es un plásmido obtenido a partir de PTM que contiene la secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus de sarampión (cepa Schwarz) y una unidad de expresión adicional ubicada entre los genes P y M, conteniendo esta unidad la secuencia de nucleótidos del dominio III de la proteína de envuelta del virus del Nilo Occidental (WNV) (WNV IS-98-ST1) fusionada a la secuencia 1-40 de la proteína de membrana M.

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

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

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

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

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

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

45 La divulgación describe cada y cualquier fragmento de nucleótido contenido en los polinucleótidos insertados en los plásmidos depositados a los que se hace referencia en el presente documento y especialmente cada y cualquier región adecuada para diseñar el inserto, de acuerdo con la presente divulgación. La divulgación también describe el uso de estos fragmentos para la construcción de los plásmidos de la invención.

50 La invención también se refiere a métodos para producir células recombinantes que expresan de manera estable las tres o al menos las tres siguientes proteínas, una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlST7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1, que comprenden o consisten en:

- 55 a. recombinar el genoma de una célula con al menos:
- 60 - un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlST7),
- 65 - un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y

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

b. seleccionar las células que producen de manera estable al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlst7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1.

o

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

- al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlst7) bajo el control de un promotor.

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

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

- un ADN solapado y

b. seleccionar las células que producen de manera estable al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlst7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1.

En una realización particular de la invención, el método para producir células recombinantes comprende adicionalmente recombinar el genoma de las células recombinantes en la etapa a. del método anterior con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) o un derivado funcional de la misma de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y seleccionar las células que producen de manera estable al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlst7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y que producen una proteína larga (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1.

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

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

Ejemplos

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

CÉLULAS Y VIRUS

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

CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Para permitir la fácil recombinación de secuencias adicionales utilizando el sistema de recombinación Gateway® (Invitrogen), el casete Gateway® (attbl/attb Seq) se introdujo por ligamiento en el vector de plásmido HIV-1-

TRIPΔU3-BSX (Zennou y col., 2000) linearizado mediante digestión con *SmaI*. El gen de ARN polimerasa de T7 se amplificó a partir del plásmido pAR-1173 (Brookhaven National Laboratory, ref) por PCR utilizando ADN polimerasa *PfuTurbo* (Stratagene) y los siguientes cebadores que contienen las secuencias de recombinación Gateway® (subrayado):

5 AttB1-T7Pol : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGG AATTCTCTGACATCGAACTGGCT-3'

AttB2-retourT7Pol : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCAC
GCGAACGCGAAGTCCGACTCTAAGATGTC-3'

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

15 AttBI-SV40nls : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATG
GCACCAAAAAAGAAGAGAAAGGTA-3'

AttB2-retourT7Pol: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCACG
CGAACGCGAAGTCCGACTCTAAGATGTC-3'

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

25 AttB1-N : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCCACAC TTTTAAGGAGCTTAGCA-3'
AttB2-N : 5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTGTACTAGTCTAG AAGATTCTGTGCATTGTA-3'
AttB1-P : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCAGAAG AGCAGGCACGCCAT-3'
AttB2-P : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTACTACTTCAT
TATTATCTTCATCAGCATCTGGTGGA-3'

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

El plásmido pEMC-LSchw que expresa la proteína de polimerasa larga (L) a partir de Schwarz MV se construyó de manera similar a como se describe en Radecke y col. (1995). La secuencia de 6552 nucleótidos de largo del gen Schwarz L se tomó del plásmido pTM-MV Schw (Combredet y col., 2003) y se insertó en el plásmido pEMC-La descrito previamente en Radecke y col (1995), utilizando procedimientos clásicos de clonación. Este plásmido se depositó con el CNCM el 18 de diciembre de 2007, bajo el número I-3881.

45 PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS DE VECTOR

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

50 GENERACIÓN DE LÍNEAS DE CÉLULAS 293-T7-MV

55 Las células (HEK-293) se sembraron en pocillos de 35 mm un día antes de la transducción por vectores lentivirales TRIP-T7 y TRIP-nlsT7. Los vectores (500 ng/ml p24) se agregaron en DMEM complementado con FCS al 10 %. Durante 8 días, la misma cantidad de vector se agregó repetidamente cada día sobre las células. Las células se expandieron cada dos días. Después de cada pasaje, se determinó la actividad de la ARN polimerasa de T7 de las células. Un cultivo celular de 35 mm se transfectó con 5 μg de pEMC-LUC utilizando el procedimiento de calcio-fosfato y la actividad de luciferasa en 1/20 del lisado de células aclarado recolectado un día después de la transfección se midió en un luminómetro. La actividad de luciferasa aumentó después de cada transducción adicional y permaneció máxima entre la séptima y octava transducción. La ausencia de citotoxicidad de la expresión de ARN polimerasa de T7 se demostró después de cada transducción cuantificando la viabilidad celular utilizando el método de exclusión con azul de tripano y comparación con células no transducidas. Después de 8 etapas de
65 transducción, se generaron dos poblaciones celulares con una actividad de ARN polimerasa de T7 muy alta, bien citoplasmática (293-T7) o nuclear (293-nlsT7).

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

RESCATE DE SCHWARZ MV UTILIZANDO CÉLULAS AUXILIARES 293-T7-NP Y 293-NLST7-NP

Para evaluar la capacidad de diferentes clones de células auxiliares 293-T7-NP y 293-nlsT7-NP generados de rescatar eficazmente MV a partir de ADNc, se usó el plásmido pTM-MV Schw-eGFP (Combredet y col., 2003) para rescatar un Schwarz MV recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (eGFP). Se usó un sistema similar al que se ha descrito anteriormente (Radecke y col., Park y col., 1999; Combredet y col., 2003). Las células auxiliares 293-T7-NP o 293-nlsT7-NP se transfectaron utilizando el procedimiento de calcio fosfato con pTM-MV Schw-eGFP (5 µg) y el plásmido pEMC-LSchw que expresa el gen de polimerasa (L) Schwarz MV (20-100 ng). Después de incubación durante una noche a 37° C, el medio de transfección se reemplazó con medio fresco y las células se sometieron a choque térmico a 43° C durante 3 horas, después se regresaron a 37° C (22). Después de dos días de incubación a 37° C, las células transfectadas se transfirieron a monocapas de células Vero, CEF o MRC5 y se incubaron a 37° C en placas de 10 cm, excepto para CEF, las cuales se incubaron a 32° C. Las células fluorescentes aparecieron rápidamente después de 2-3 días de co-cultivo en células Vero, CEF o MRC5. Las células infectadas se expandieron rápidamente en focos. El virus recombinante fue altamente sincitial en células Vero y no sincitial en células CEF y MRC5. Los sincitios únicos o focos infecciosos se transfirieron a pocillos de 35 mm de células Vero, CEF o MRC5, después se expandieron a placas más grandes agregando células frescas. El virus se recogió a partir de las células CEF o MRC5 después de 5 días de infección y a partir de las células Vero cuando los sincitios implicaron el 80-90 % del cultivo (habitualmente después de 2 días) mediante el raspado de las células infectadas, la congelación-descongelación de las células y el medio y la centrifugación para remover los desechos celulares. Tales producciones virales se titularon utilizando el método de titulación TCID₅₀. Brevemente, las células Vero se sembraron en placa de 96 pocillos (7500 células/pocillo) y se infectaron mediante diluciones en serie 1:10 de muestra de virus en DMEM/FCS al 5 %. Después de la incubación a 37° C durante 7 días, las células se tiñeron con violeta cristal y se determinó la dilución del virus que dio como resultado infección en el 50 % de la unidad de ensayo. El punto final del 50 % descrito como dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID₅₀) se calculó por el método Kräber (3). El virus recombinante rescatado y cultivado en células Vero tuvo títulos de 10^7 - 10^8 TCID₅₀/ml y el virus rescatado y cultivado en células CEF o MRC5 tuvo títulos más bajos de 10^4 - 10^6 TCID₅₀/ml.

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

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

Bibliografía

Arnebo, P., G. Biberfeld, M. Forsgren y L. V. von Stedingk. 1983. Specific and non-specific B cell activation in measles and varicella. *Clin Exp Immunol* 51: 165-72.

5 Baron, M. D. y T. Barrett. 1997. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J Virol* 71 :1265-71.

Buchholz, U. J., H. Granzow, K. Schuldt, S. S. Whitehead, B. R. Murphy y P. L. Collins. 2000. Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. *J Virol* 74:1187-99.

10 C.D.C. 2005. Progress in reducing measles mortality-worldwide, 1999-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 54:200-203.

15 Calain, P., and L. Roux. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67:4822-30.

Clarke, D. K., M. S. Sidhu, J. E. Johnson y S. A. Udem. 2000. Rescue of mumps virus from cDNA. *J Virol* 74:4831-8.

20 Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock, y B.R. Murphy. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:11563-7.

25 Combredet, C, V. Labrousse-Najburg, L. Mollet, C. Lorin, F. Delebecque, B. Hurtrel, H. McClure, M. Feinberg, M. Brahic y F. Tangy. 2003. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgénic mice. *Journal of Virology* 77:11546-11554.

30 Das, S. C, M. D. Baron y T. Barrett. 2000. Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of peste-des-petits-ruminants virus: homologous F and H proteins are required for virus viability. *J Virol* 74:9039-47.

35 Durbin, A. P., S. L. Hall, J. W. Siew, S. S. Whitehead, P. L. Collins, and B.R. Murphy. 1997. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* 235:323-32.

Enders, J. F. y T. C. Peebles. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:277-286.

40 Finke, S. y K. K. Conzelmann. 1999. Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. *J Virol* 73:3818-25.

45 Fujii, Y., T. Sakaguchi, K. Kiyotani, C. Huang, N. Fukuhara, Y. Egi, y T. Yoshida. 2002. Involvement of the leader sequence in Sendai virus pathogenesis revealed by recovery of a pathogenic field isolate from cDNA. *J Virol* 76:8540-7.

Garcin, D., P. Latorre, y D. Kolakofsky. 1999. Sendai virus C proteins counteract the interferon-mediated induction of an antiviral state. *J Virol* 73:6559-65.

50 Gassen, U., F. M. Collins, W. P. Duprex y B. K. Rima. 2000. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *J Virol* 74:10737-44.

55 Griffin, D. 2001. Measles virus, págs. 1401-1441. En D. Knipe y P. Howley (ed.), *Field's Virology*, 4ª Edición, vol. 2. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.

Harty, R. N., M. E. Brown, F. P. Hayes, N. T. Wright y M. J. Schnell. 2001. Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:513-7.

60 He, B., R. G. Paterson, C. D. Ward y R. A. Lamb. 1997. Recovery of infectious SV5 from cloned DNA and expression of a foreign gene. *Virology* 237:249-60.

Hilleman, M. 2002. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* 20:651-665.

65

- Hoffman, M. A. y A. K. Banerjee. 1997. An infectious clone of human parainfluenza virus type 3. *J Virol* 71 :4272-7.
- 5 Ito, N., M. Takayama, K. Yamada, M. Sugiyama y N. Minamoto. 2001. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *J Virol* 75:9121-8.
- Kato, A., Y. Sakai, T. Shioda, T. Kondo, M. Nakanishi, e Y. Nagai. 1996. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* 1: 569-79.
- 10 Kawano, M., M. Kaito, Y. Kozuka, H. Komada, N. Noda, K. Nanba, M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio e Y. Ito. 2001. Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain. *Virology* 284:99- 112.
- 15 Kim, E. A., K. S. Lee, S. L. Primack, H. K. Yoon, H. S. Byun, T. S. Kim, G. Y. Suh, O. J. Kwon y J. Han. 2002. Viral pneumonias in adults: radiologic and pathologic findings. *Radiographics* 22 Spec N° S137-49.
- Lawson, N. D., E. A. Stillman, M. A. Whitt, y J. K. Rose. 1995. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:4477-81.
- 20 Leyrer, S., W. J. Neubert, y R. Sedlmeier. 1998. Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J Virol Methods* 75:47-58.
- 25 Okada, H., F. Kobune, T. A. Sato, T. Kohama, Y. Takeuchi, T. Abe, N. Takayama, T. Tsuchiya y M. Tashiro. 2000. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 145:905-20.
- 30 Okada, H., T. A. Sato, A. Katayama, K. Higuchi, K. Shichijo, T. Tsuchiya, N. Takayama, Y. Takeuchi, T. Abe, N. Okabe y M. Tashiro. 2001. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146:859-74.
- Ovsyannikova, I., N. Dhiman, R. Jacobson, R. Vierkant y G. Poland. 2003. Frequency of measles virus-specific CD4+ and CD8+ T cells in subjects seronegative or highly seropositive for measles vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:411-416.
- 35 Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, M. S. Sidhu, y S. A. Udem. 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol* 73:3560-6.
- 40 Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu y S. A. Udem. 2001a. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75:921-33.
- Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu y S. A. Udem. 2001 b. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75:910-20.
- 45 Peeters, B. P., O. S. de Leeuw, G. Koch y A. L. Gielkens. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73:5001-9.
- Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen, y M. A. Billeter. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo J* 14:5773-84.
- 50 Romer-Oberdorfer, A., E. Mundt, T. Mebatsion, U. J. Buchholz y T. C. Mettenleiter. 1999. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol* 80 (Pt 11):2987-95.
- Schmidt, A. C, J. M. McAuliffe, A. Huang, S. R. Surman, J. E. Bailly, W. R. Elkins, P. L. Collins, B. R. Murphy, y M. H. Skiadopoulos. 2000. Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates. *J Virol* 74:8922-9.
- 55 Schneider, H., P. Spielhofer, K. Kaelin, C. Dotsch, F. Radecke, G. Sutter y M. A. Billeter. 1997. Rescue of measles virus using a replication- deficient vaccinia-T7 vector. *J Virol Methods* 64:57-64.
- 60 Schnell, M. J., L. Buonocore, E. Kretzschmar, E. Johnson, y J. K. Rose. 1996. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93:11359-65.
- 65 Schnell, M. J., T. Mebatsion, y K. K. Conzelmann. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J* 13:4195-203.

Schwarz, A. 1962. Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine. *Am. J. Dis. Child.* 103:216-219.

Sirven, A., E. Ravet, P. Charneau, V. Zennou, L. Coulombel, D. Guetard, F. Pflumio y A. Dubart-Kupperschmitt. 2001. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCI D mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:438-48.

Takeda, M., K. Takeuchi, N. Miyajima, F. Kobune, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, Y. Nagai y M. Tashiro. 2000. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J Virol* 74:6643-7.

Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Muhlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, y H. D. Klenk. 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291 :1965-9.

Whelan, S. P., L. A. Ball, J. N. Barr y G. T. Wertz. 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92: 8388-92.

Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier y P. Charneau. 2000. VIH-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101: 173-85.

Zennou, V., C. Serguera, C. Sarkis, P. Colin, E. Perret, J. Mallet y P. Charneau. 2001. The VIH-1 DNA flap stimulates VIH vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19: 446-50.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR

<120> CÉLULAS Y METODOLOGÍA PARA GENERAR VIRUS DE ARN DE CADENA DE SENTIDO NEGATIVO NO SEGMENTADA

<130> B6773A-AD/LV/KN

<150> EP06292025.1

<151> 22-12-2006

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 200

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CAEV FLAP

<400> 1

gttccagcca caatttgtcg ctgtagaatc agccatagca gcagccctag tcgccataaa 60

tataaaaaga aagggtgggc tggggacaag ccctatggat atttttatat ataataaaga 120

acagaaaaga ataaataata aatataataa aaattctcaa aaaattcaat tctgttatta 180

cagaataagg aaaagaggac 200

<210> 2

<211> 200

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> EIAV FLAP

<400> 2

ES 2 686 168 T3

cttgtaacaa agggagggaa agtatgggag gacagacacc atgggaagta tttatcacta 60
 atcaagcaca agtaatacat gagaaacttt tactacagca agcacaatcc tccaaaaaat 120
 tttgttttta caaaatccct ggtgaacatg attggaaggg acctactagg gtgctgtgga 180
 agggatgatgg tgcagtagta 200

5 <210> 3
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VISNA FLAP
 <400> 3

ggaccctcat tactctaaat ataaaaagaa agggatgggct agggacaagc cctatggata 60
 tatttatatt taataaggaa caacaagaa tacagcaaca aagtaaatca aaacaagaaa 120
 aaattcgatt ttgttattac agaacaagaa aaagagggca tccaggagag tggcaaggac 180
 caacacaggt actttggggc 200

15 <210> 4
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> SIV AGM FLAP
 <400> 4

tactgatggc ttgcatactt cacaatttta aaagaaaggg aggaataggg ggacagactt 60
 cagcagagag actaattaat ataataacaa cacaattaga aatacaacat ttacaaacca 120
 aaattcaaaa aatttttaaat tttagagtct actacagaga agggagagac cctgtgtgga 180
 25 aaggaccggc acaattaatc 200

30 <210> 5
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> HIV-2 ROD FLAP
 <400> 5

tgcattgaatt ttaaaagaag ggggggaata ggggatatga ctccatcaga aagattaatc 60
 aatatgatca ccacagaaca agagatacaa ttcctccaag ccaaaaattc aaaattaaaa 120
 gattttcggg tctatttcag agaaggcaga gatcagttgt ggaaaggacc tggggaacta 180
 ctgtggaaag gagaaggagc 200

40 <210> 6
 <211> 200
 <212> ADN

ES 2 686 168 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> HIV-1 LAI FLAP
 5 <400> 6

 cagtattcat ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg ggggtacagt gcaggggaaa 60
 gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa caaattacaa 120
 aaattcaaaa ttttcggggt tattacaggg acagcagaga tccactttgg aaaggaccag 180
 caaagctcct ctggaaaggt 200

 10 <210> 7
 <211> 119
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> HIV-1 FLAP

 <400> 7

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

 <210> 8
 <211> 2640
 <212> ADN
 25 <213> Bacteriófago T7
 <220>

 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(2640)
 <223> Gen de ARN polimerasa de T7

 <220>
 <221> CDS
 35 <222> (10)..(2637)

 <400> 8

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

735					740					745					750	
cct	acc	att	aac	acc	aac	aaa	gat	agc	gag	att	gat	gca	cac	aaa	cag	2307
Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Asn	Lys	Asp	Ser	Glu	Ile	Asp	Ala	His	Lys	Gln	
				755					760					765		
gag	tct	ggt	atc	gct	cct	aac	ttt	gta	cac	agc	caa	gac	ggt	agc	cac	2355
Glu	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Asn	Phe	Val	His	Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	His	
			770					775					780			
ctt	cgt	aag	act	gta	gtg	tgg	gca	cac	gag	aag	tac	gga	atc	gaa	tct	2403
Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Trp	Ala	His	Glu	Lys	Tyr	Gly	Ile	Glu	Ser	
		785					790					795				
ttt	gca	ctg	att	cac	gac	tcc	ttc	ggt	acc	att	ccg	gct	gac	gct	gcg	2451
Phe	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Ser	Phe	Gly	Thr	Ile	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	
	800					805					810					
aac	ctg	ttc	aaa	gca	gtg	cgc	gaa	act	atg	gtt	gac	aca	tat	gag	tct	2499
Asn	Leu	Phe	Lys	Ala	Val	Arg	Glu	Thr	Met	Val	Asp	Thr	Tyr	Glu	Ser	
	815				820					825					830	
tgt	gat	gta	ctg	gct	gat	ttc	tac	gac	cag	ttc	gct	gac	cag	ttg	cac	2547
Cys	Asp	Val	Leu	Ala	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gln	Phe	Ala	Asp	Gln	Leu	His	
				835					840					845		
gag	tct	caa	ttg	gac	aaa	atg	cca	gca	ctt	ccg	gct	aaa	ggt	aac	ttg	2595
Glu	Ser	Gln	Leu	Asp	Lys	Met	Pro	Ala	Leu	Pro	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	
			850					855					860			
aac	ctc	cgt	gac	atc	tta	gag	tcg	gac	ttc	gcg	ttc	gcg	tga	taa		2640
Asn	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Glu	Ser	Asp	Phe	Ala	Phe	Ala				
		865				870						875				

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

5

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

10

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

Ser Arg Arg Ile Ser Leu Glu Phe Met Leu Glu Gln Ala Asn Lys Phe
 385 390 395 400

Ala Asn His Lys Ala Ile Trp Phe Pro Tyr Asn Met Asp Trp Arg Gly
 405 410 415

Arg Val Tyr Ala Val Ser Met Phe Asn Pro Gln Gly Asn Asp Met Thr
 420 425 430

Lys Gly Leu Leu Thr Leu Ala Lys Gly Lys Pro Ile Gly Lys Glu Gly
 435 440 445

Tyr Tyr Trp Leu Lys Ile His Gly Ala Asn Cys Ala Gly Val Asp Lys
 450 455 460

Val Pro Phe Pro Glu Arg Ile Lys Phe Ile Glu Glu Asn His Glu Asn
 465 470 475 480

Ile Met Ala Cys Ala Lys Ser Pro Leu Glu Asn Thr Trp Trp Ala Glu
 485 490 495

Gln Asp Ser Pro Phe Cys Phe Leu Ala Phe Cys Phe Glu Tyr Ala Gly
 500 505 510

Val Gln His His Gly Leu Ser Tyr Asn Cys Ser Leu Pro Leu Ala Phe
 515 520 525

Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Gln His Phe Ser Ala Met Leu Arg Asp
 530 535 540

Glu Val Gly Gly Arg Ala Val Asn Leu Leu Pro Ser Glu Thr Val Gln
 545 550 555 560

Asp Ile Tyr Gly Ile Val Ala Lys Lys Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala
 565 570 575

Asp Ala Ile Asn Gly Thr Asp Asn Glu Val Val Thr Val Thr Asp Glu
 580 585 590

Asn Thr Gly Glu Ile Ser Glu Lys Val Lys Leu Gly Thr Lys Ala Leu
 595 600 605

Ala Gly Gln Trp Leu Ala His Gly Val Thr Arg Ser Val Thr Lys Arg
 610 615 620

Ser Val Met Thr Leu Ala Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Gly Phe Arg Gln
 625 630 635 640

Gln Val Leu Glu Asp Thr Ile Gln Pro Ala Ile Asp Ser Gly Lys Gly
 645 650 655

ES 2 686 168 T3

Pro Met Phe Thr Gln Pro Asn Gln Ala Ala Gly Tyr Met Ala Lys Leu
660 665 670

Ile Trp Glu Ser Val Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met
675 680 685

Asn Trp Leu Lys Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp
690 695 700

Lys Lys Thr Gly Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val
705 710 720

Thr Pro Asp Gly Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln
725 730 735

Thr Arg Leu Asn Leu Met Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr
740 745 750

Ile Asn Thr Asn Lys Asp Ser Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser
755 760 765

Gly Ile Ala Pro Asn Phe Val His Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg
770 775 780

Lys Thr Val Val Trp Ala His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala
785 790 800

Leu Ile His Asp Ser Phe Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu
805 810 815

Phe Lys Ala Val Arg Glu Thr Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp
820 825 830

Val Leu Ala Asp Phe Tyr Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser
835 840 845

Gln Leu Asp Lys Met Pro Ala Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu
850 855 860

Arg Asp Ile Leu Glu Ser Asp Phe Ala Phe Ala
865 870 875

- 5 <210> 10
- <211> 2676
- <212> ADN
- <213> Bacteriófago T7
- <220>
- <221> misc_feature
- 10 <222> (1)..(2676)
- <223> Gen de ARN polimerasa de nls T7
- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (10)..(2673)

ES 2 686 168 T3

<400> 10

ggctccacc	atg	gca	cca	aaa	aag	aag	aga	aag	gta	gaa	gac	ccc	aag	gaa	51	
	Met	Ala	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Glu	Asp	Pro	Lys	Glu		
	1				5					10						
ttc	tct	gac	atc	gaa	ctg	gct	gct	atc	ccg	ttc	aac	act	ctg	gct	gac	99
Phe	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Phe	Asn	Thr	Leu	Ala	Asp	
15					20					25					30	
cat	tac	ggt	gag	cgt	tta	gct	cgc	gaa	cag	ttg	gcc	ctt	gag	cat	gag	147
His	Tyr	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu	Glu	His	Glu	
				35					40					45		
tct	tac	gag	atg	ggt	gaa	gca	cgc	ttc	cgc	aag	atg	ttt	gag	cgt	caa	195
Ser	Tyr	Glu	Met	Gly	Glu	Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Met	Phe	Glu	Arg	Gln	
			50					55					60			
ctt	aaa	gct	ggt	gag	ggt	gcg	gat	aac	gct	gcc	gcc	aag	cct	ctc	atc	243
Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Val	Ala	Asp	Asn	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Leu	Ile	
		65					70					75				
act	acc	cta	ctc	cct	aag	atg	att	gca	cgc	atc	aac	gac	tgg	ttt	gag	291
Thr	Thr	Leu	Leu	Pro	Lys	Met	Ile	Ala	Arg	Ile	Asn	Asp	Trp	Phe	Glu	
	80					85					90					
gaa	gtg	aaa	gct	aag	cgc	ggc	aag	cgc	ccg	aca	gcc	ttc	cag	ttc	ctg	339
Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Arg	Gly	Lys	Arg	Pro	Thr	Ala	Phe	Gln	Phe	Leu	
95					100					105					110	
caa	gaa	atc	aag	ccg	gaa	gcc	gta	gcg	tac	atc	acc	att	aag	acc	act	387
Gln	Glu	Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Tyr	Ile	Thr	Ile	Lys	Thr	Thr	
				115					120					125		
ctg	gct	tgc	cta	acc	agt	gct	gac	aat	aca	acc	gtt	cag	gct	gta	gca	435
Leu	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser	Ala	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Val	Ala	
			130					135					140			
agc	gca	atc	ggt	cgg	gcc	att	gag	gac	gag	gct	cgc	ttc	ggt	cgt	atc	483
Ser	Ala	Ile	Gly	Arg	Ala	Ile	Glu	Asp	Glu	Ala	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	
		145					150					155				
cgt	gac	ctt	gaa	gct	aag	cac	ttc	aag	aaa	aac	gtt	gag	gaa	caa	ctc	531
Arg	Asp	Leu	Glu	Ala	Lys	His	Phe	Lys	Lys	Asn	Val	Glu	Glu	Gln	Leu	
	160					165					170					
aac	aag	cgc	gta	ggg	cac	gtc	tac	aag	aaa	gca	ttt	atg	caa	gtt	gtc	579
Asn	Lys	Arg	Val	Gly	His	Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	Met	Gln	Val	Val	
175					180					185					190	
gag	gct	gac	atg	ctc	tct	aag	ggt	cta	ctc	ggt	ggc	gag	gcg	tgg	tct	627
Glu	Ala	Asp	Met	Leu	Ser	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	
				195					200					205		
tcg	tgg	cat	aag	gaa	gac	tct	att	cat	gta	gga	gta	cgc	tgc	atc	gag	675
Ser	Trp	His	Lys	Glu	Asp	Ser	Ile	His	Val	Gly	Val	Arg	Cys	Ile	Glu	
			210					215					220			
atg	ctc	att	gag	tca	acc	gga	atg	gtt	agc	tta	cac	cgc	caa	aat	gct	723
Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Met	Val	Ser	Leu	His	Arg	Gln	Asn	Ala	
		225					230					235				
ggc	gta	gta	ggt	caa	gac	tct	gag	act	atc	gaa	ctc	gca	cct	gaa	tac	771
Gly	Val	Val	Gly	Gln	Asp	Ser	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala	Pro	Glu	Tyr	

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

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

 <400> 11

5

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

10

ES 2 686 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 686 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 686 168 T3

Val Ser Val Thr Val Val Ala Ala Val Glu Ala Met Asn Trp Leu Lys
 690 695 700

Ser Ala Ala Lys Leu Leu Ala Ala Glu Val Lys Asp Lys Lys Thr Gly
 705 710 715

Glu Ile Leu Arg Lys Arg Cys Ala Val His Trp Val Thr Pro Asp Gly
 720 725 730 735

Phe Pro Val Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Pro Ile Gln Thr Arg Leu Asn
 740 745 750

Leu Met Phe Leu Gly Gln Phe Arg Leu Gln Pro Thr Ile Asn Thr Asn
 755 760 765

Lys Asp Ser Glu Ile Asp Ala His Lys Gln Glu Ser Gly Ile Ala Pro
 770 775 780

Asn Phe Val His Ser Gln Asp Gly Ser His Leu Arg Lys Thr Val Val
 785 790 795 800

Trp Ala His Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ala Leu Ile His Asp
 805 810 815

Ser Phe Gly Thr Ile Pro Ala Asp Ala Ala Asn Leu Phe Lys Ala Val
 820 825 830

Arg Glu Thr Met Val Asp Thr Tyr Glu Ser Cys Asp Val Leu Ala Asp
 835 840 845

Phe Tyr Asp Gln Phe Ala Asp Gln Leu His Glu Ser Gln Leu Asp Lys
 850 855 860

Met Pro Ala Leu Pro Ala Lys Gly Asn Leu Asn Leu Arg Asp Ile Leu
 865 870 875 880

Glu Ser Asp Phe Ala Phe Ala
 885

5

<210> 12
 <211> 1578
 <212> ADN
 <213> *Virus del sarampión*

10

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

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1578)
 <223> Gen de Schwarz MV N

<400> 12

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

<210> 13
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> *Virus del sarampión*

ES 2 686 168 T3

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 686 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
 <211> 1524
 <212> ADN

<213> *Virus del sarampión*

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(1524)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1524)

10 <223> Gen de Schwarz MV P

<400> 14

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

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

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

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

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

<400> 16

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

705	710					715					720					
ccg tta tat aaa gtc ccc aat gat caa atc ttc att aag tac cct atg Pro Leu Tyr Lys Val Pro Asn Asp Gln Ile Phe Ile Lys Tyr Pro Met 725 730 735																2208
gga ggt ata gaa ggg tat tgt cag aag ctg tgg acc atc agc acc att Gly Gly Ile Glu Gly Tyr Cys Gln Lys Leu Trp Thr Ile Ser Thr Ile 740 745 750																2256
ccc tat cta tac ctg gct gct tat gag agc gga gta agg att gct tcg Pro Tyr Leu Tyr Leu Ala Ala Tyr Glu Ser Gly Val Arg Ile Ala Ser 755 760 765																2304
tta gtg caa ggg gac aat cag acc ata gcc gta aca aaa agg gta ccc Leu Val Gln Gly Asp Asn Gln Thr Ile Ala Val Thr Lys Arg Val Pro 770 775 780																2352
agc aca tgg ccc tac aac ctt aag aaa cgg gaa gct gct aga gta act Ser Thr Trp Pro Tyr Asn Leu Lys Lys Arg Glu Ala Ala Arg Val Thr 785 790 800																2400
aga gat tac ttt gta att ctt agg caa agg cta cat gat att ggc cat Arg Asp Tyr Phe Val Ile Leu Arg Gln Arg Leu His Asp Ile Gly His 805 810 815																2448
cac ctc aag gca aat gag aca att gtt tca tca cat ttt ttt gtc tat His Leu Lys Ala Asn Glu Thr Ile Val Ser Ser His Phe Phe Val Tyr 820 825 830																2496
tca aaa gga ata tat tat gat ggg cta ctt gtg tcc caa tca ctc aag Ser Lys Gly Ile Tyr Tyr Asp Gly Leu Leu Val Ser Gln Ser Leu Lys 835 840 845																2544
agc atc gca aga tgt gta ttc tgg tca gag act ata gtt gat gaa aca Ser Ile Ala Arg Cys Val Phe Trp Ser Glu Thr Ile Val Asp Glu Thr 850 855 860																2592
agg gca gca tgc agt aat att gct aca aca atg gct aaa agc atc gag Arg Ala Ala Cys Ser Asn Ile Ala Thr Thr Met Ala Lys Ser Ile Glu 865 870 875 880																2640
aga ggt tat gac cgt tac ctt gca tat tcc ctg aac gtc cta aaa gtg Arg Gly Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Tyr Ser Leu Asn Val Leu Lys Val 885 890 895																2688
ata cag caa att ctg atc tct ctt ggc ttc aca atc aat tca acc atg Ile Gln Gln Ile Leu Ile Ser Leu Gly Phe Thr Ile Asn Ser Thr Met 900 905 910																2736
acc cgg gat gta gtc ata ccc ctc ctc aca aac aac gac ctc tta ata Thr Arg Asp Val Val Ile Pro Leu Leu Thr Asn Asn Asp Leu Leu Ile 915 920 925																2784
agg atg gca ctg ttg ccc gct cct att ggg ggg atg aat tat ctg aat Arg Met Ala Leu Leu Pro Ala Pro Ile Gly Gly Met Asn Tyr Leu Asn 930 935 940																2832
atg agc agg ctg ttt gtc aga aac atc ggt gat cca gta aca tca tca Met Ser Arg Leu Phe Val Arg Asn Ile Gly Asp Pro Val Thr Ser Ser 945 950 955 960																2880
att gct gat ctc aag aga atg att ctc gcc tca cta atg cct gaa gag Ile Ala Asp Leu Lys Arg Met Ile Leu Ala Ser Leu Met Pro Glu Glu 965 970 975																2928
acc ctc cat caa gta atg aca caa caa ccg ggg gac tct tca ttc cta Thr Leu His Gln Val Met Thr Gln Gln Pro Gly Asp Ser Ser Phe Leu 980 985 990																2976

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

<210> 17
 <211> 2183
 <212> PRT
 <213> *Virus del sarampión*

<400> 17

Met Asp Ser Leu Ser Val Asn Gln Ile Leu Tyr Pro Glu Val His Leu
 1 5 10 15

Asp Ser Pro Ile Val Thr Asn Lys Ile Val Ala Ile Leu Glu Tyr Ala
 20 25 30

Arg Val Pro His Ala Tyr Ser Leu Glu Asp Pro Thr Leu Cys Gln Asn
 35 40 45

5

10

ES 2 686 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 686 168 T3

Phe Ser Asp Glu Gly Thr Tyr His Glu Leu Thr Glu Ala Leu Asp Tyr
 325 330 335
 Ile Phe Ile Thr Asp Asp Ile His Leu Thr Gly Glu Ile Phe Ser Phe
 340 345 350
 Phe Arg Ser Phe Gly His Pro Arg Leu Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu
 355 360 365
 Asn Val Arg Lys Tyr Met Asn Gln Pro Lys Val Ile Val Tyr Glu Thr
 370 375 380
 Leu Met Lys Gly His Ala Ile Phe Cys Gly Ile Ile Ile Asn Gly Tyr
 385 390 395
 Arg Asp Arg His Gly Gly Ser Trp Pro Pro Leu Thr Leu Pro Leu His
 405 410 415
 Ala Ala Asp Thr Ile Arg Asn Ala Gln Ala Ser Gly Glu Gly Leu Thr
 420 425 430
 His Glu Gln Cys Val Asp Asn Trp Lys Ser Phe Ala Gly Val Lys Phe
 435 440 445
 Gly Cys Phe Met Pro Leu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Thr Met Tyr Leu
 450 455 460
 Lys Asp Lys Ala Leu Ala Ala Leu Gln Arg Glu Trp Asp Ser Val Tyr
 465 470 475 480
 Pro Lys Glu Phe Leu Arg Tyr Asp Pro Pro Lys Gly Thr Gly Ser Arg
 485 490 495
 Arg Leu Val Asp Val Phe Leu Asn Asp Ser Ser Phe Asp Pro Tyr Asp
 500 505 510
 Val Ile Met Tyr Val Val Ser Gly Ala Tyr Leu His Asp Pro Glu Phe
 515 520 525
 Asn Leu Ser Tyr Ser Leu Lys Glu Lys Glu Ile Lys Glu Thr Gly Arg
 530 535 540
 Leu Phe Ala Lys Met Thr Tyr Lys Met Arg Ala Cys Gln Val Ile Ala
 545 550 555 560
 Glu Asn Leu Ile Ser Asn Gly Ile Gly Lys Tyr Phe Lys Asp Asn Gly
 565 570 575
 Met Ala Lys Asp Glu His Asp Leu Thr Lys Ala Leu His Thr Leu Ala
 580 585 590

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

Lys Glu Ser Cys Ser Val Gln Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ser His
 1130 1135 1140
 Met Trp Ala Arg Leu Ala Arg Gly Arg Pro Ile Tyr Gly Leu Glu
 1145 1150 1155
 Val Pro Asp Val Leu Glu Ser Met Arg Gly His Leu Ile Arg Arg
 1160 1165 1170
 His Glu Thr Cys Val Ile Cys Glu Cys Gly Ser Val Asn Tyr Gly
 1175 1180 1185
 Trp Phe Phe Val Pro Ser Gly Cys Gln Leu Asp Asp Ile Asp Lys
 1190 1195 1200
 Glu Thr Ser Ser Leu Arg Val Pro Tyr Ile Gly Ser Thr Thr Asp
 1205 1210 1215
 Glu Arg Thr Asp Met Lys Leu Ala Phe Val Arg Ala Pro Ser Arg
 1220 1225 1230
 Ser Leu Arg Ser Ala Val Arg Ile Ala Thr Val Tyr Ser Trp Ala
 1235 1240 1245
 Tyr Gly Asp Asp Asp Ser Ser Trp Asn Glu Ala Trp Leu Leu Ala
 1250 1255 1260
 Arg Gln Arg Ala Asn Val Ser Leu Glu Glu Leu Arg Val Ile Thr
 1265 1270 1275
 Pro Ile Ser Thr Ser Thr Asn Leu Ala His Arg Leu Arg Asp Arg
 1280 1285 1290
 Ser Thr Gln Val Lys Tyr Ser Gly Thr Ser Leu Val Arg Val Ala
 1295 1300 1305
 Arg Tyr Thr Thr Ile Ser Asn Asp Asn Leu Ser Phe Val Ile Ser
 1310 1315 1320
 Asp Lys Lys Val Asp Thr Asn Phe Ile Tyr Gln Gln Gly Met Leu
 1325 1330 1335
 Leu Gly Leu Gly Val Leu Glu Thr Leu Phe Arg Leu Glu Lys Asp
 1340 1345 1350
 Thr Gly Ser Ser Asn Thr Val Leu His Leu His Val Glu Thr Asp
 1355 1360 1365
 Cys Cys Val Ile Pro Met Ile Asp His Pro Arg Ile Pro Ser Ser
 1370 1375 1380

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

Val Leu Thr Asp His Ile Lys Ala Glu Ala Met Leu Ser Pro Ala
 1640 1645 1650

Gly Ser Ser Trp Asn Ile Asn Pro Ile Ile Val Asp His Tyr Ser
 1655 1660 1665

Cys Ser Leu Thr Tyr Leu Arg Arg Gly Ser Ile Lys Gln Ile Arg
 1670 1675 1680

Leu Arg Val Asp Pro Gly Phe Ile Phe Asp Ala Leu Ala Glu Val
 1685 1690 1695

Asn Val Ser Gln Pro Lys Ile Gly Ser Asn Asn Ile Ser Asn Met
 1700 1705 1710

Ser Ile Lys Ala Phe Arg Pro Pro His Asp Asp Val Ala Lys Leu
 1715 1720 1725

Leu Lys Asp Ile Asn Thr Ser Lys His Asn Leu Pro Ile Ser Gly
 1730 1735 1740

Gly Asn Leu Ala Asn Tyr Glu Ile His Ala Phe Arg Arg Ile Gly
 1745 1750 1755

Leu Asn Ser Ser Ala Cys Tyr Lys Ala Val Glu Ile Ser Thr Leu
 1760 1765 1770

Ile Arg Arg Cys Leu Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Phe Leu Gly
 1775 1780 1785

Glu Gly Ser Gly Ser Met Leu Ile Thr Tyr Lys Glu Ile Leu Lys
 1790 1795 1800

Leu Asn Lys Cys Phe Tyr Asn Ser Gly Val Ser Ala Asn Ser Arg
 1805 1810 1815

Ser Gly Gln Arg Glu Leu Ala Pro Tyr Pro Ser Glu Val Gly Leu
 1820 1825 1830

Val Glu His Arg Met Gly Val Gly Asn Ile Val Lys Val Leu Phe
 1835 1840 1845

Asn Gly Arg Pro Glu Val Thr Trp Val Gly Ser Val Asp Cys Phe
 1850 1855 1860

Asn Phe Ile Val Ser Asn Ile Pro Thr Ser Ser Val Gly Phe Ile
 1865 1870 1875

His Ser Asp Ile Glu Thr Leu Pro Asp Lys Asp Thr Ile Glu Lys
 1880 1885 1890

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

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

Ala Leu Ile Lys Asp
 2180

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

<220>
 <223> plásmido pTM-MV Schw

<400> 18

5

10

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

ES 2 686 168 T3

gcaatgcata ctactgagga caagatcagt agagcgggtg gaccagaca agcccaagta 1440
tcatttctac acggtgatca aagtgagaat gagctaccga gattgggggg caaggaagat 1500
aggaggggtca aacagagtcg aggagaagcc agggagagct acagagaaac cgggccagc 1560
agagcaagtg atgcgagagc tgcccatctt ccaaccggca caccctaga cattgacact 1620
gcaacggagt ccagccaaga tccgcaggac agtcgaaggt cagctgacgc cctgcttagg 1680
ctgcaagcca tggcaggaat ctcggaagaa caaggctcag acacggacac ccctatagtg 1740
tacaatgaca gaaatcttct agactaggtg cgagaggccg agggccagaa caacatccgc 1800
ctaccatcca tcattgttat aaaaaactta ggaaccaggt ccacacagcc gccagcccat 1860
caaccatcca ctcccacgat tggagccaat ggcagaagag caggcacgcc atgtcaaaaa 1920
cggactggaa tgcacccggg ctctcaaggc cgagcccatc ggctcactgg ccatcgagga 1980
agctatggca gcatggctcag aaatatcaga caaccagga caggagcgag ccacctgcag 2040
ggaagagaag gcaggcagtt cgggtctcag caaacatgc ctctcagaa ttggatcaac 2100
tgaaggcggg gcacctcgca tccgcggtca gggacctgga gagagcgatg acgacgctga 2160
aactttggga atcccccaa gaaatctcca ggcacatcagc actgggttac agtggtatta 2220
cgtttatgat cacagcgggtg aagcgggtta gggaaatcaa gatgctgact ctatcatggt 2280
tcaatcaggc cttgatgggtg atagaccct ctcaggagga gacaatgaat ctgaaaacag 2340
cgatgtggat attggcgaac ctgataccga gggatatgct atcactgacc ggggatctgc 2400
tcccatctct atggggttca gggcttctga tgttgaaact gcagaaggag gggagatcca 2460
cgagctcctg agactccaat ccagaggcaa caactttccg aagcttggga aaactctcaa 2520
tgttcctccg ccccgacc cggtagggc cagcacttcc gggacacca ttaaaaagg 2580
cacagacgcg agattagcct catttggaaac ggagatcgcg tctttattga cagggtgtgc 2640
aaccatgt gtcgaaagt caccctcggg accatcaggg ccagggtcac ctgccccgaa 2700
tgtccccgag tgtgtgagca atgccgact gatacaggag tggacaccg aatctggtac 2760
cacaatctcc ccgagatccc agaataatga agaaggggga gactattatg atgatgagct 2820
gttctctgat gtccaagata ttaaacagc cttggccaaa atacagagg ataacagaa 2880
gataatctcc aagctagaat cactgctgtt attgaaggga gaagttgagt caattaagaa 2940
gcagatcaac aggcaaaata tcagcatatc caccctggaa ggacacctct caagcatcat 3000
gatcgccatt cctggacttg ggaaggatcc caacgacccc actgcagatg tcgaaatcaa 3060
tcccgacttg aaaccatca taggcagaga ttcaggccga gcactggccg aagttctcaa 3120
gaaaccggtt gccagccgac aactccaagg aatgacaaat ggacggacca gttccagagg 3180
acagctgctg aaggaatttc agctaaagcc gatcgggaaa aagatgagct cagccgtcgg 3240
gtttgttctt gacaccggcc ctgcatcacg cagtgtaatc cgctccatta taaaatccag 3300
ccggctagag gaggatcgga agcgttacct gatgactctc cttgatgata tcaaggagc 3360
caatgatctt gccaaagtcc accagatgct gatgaagata ataatgaagt agctacagct 3420

ES 2 686 168 T3

caacttacct gccaacccca tgccagtcga cccaactagt acaacctaaa tccattataa 3480
 aaaacttagg agcaaagtga ttgcctccca aggtccacaa tgacagagac ctacgacttc 3540
 gacaagtcgg catgggacat caaagggtcg atcgctccga tacaaccac cacctacagt 3600
 gatggcaggc tggcgccca ggtcagagtc atagatcctg gtctaggcga caggaaggat 3660
 gaatgcttta tgtacatggt tctgctgggg gttgttgagg acagcgattc ctagggcct 3720
 ccaatcgggc gagcatttgg gttcctgcc ttaggtggtg gcagatccac agcaaagccc 3780
 gaaaaactcc tcaaagaggc cactgagctt gacatagttg ttagacgtac agcagggctc 3840
 aatgaaaaac tgggtgttcta caacaacacc ccactaactc tcctcacacc ttggagaaag 3900
 gtcctaacia cagggagtggt cttcaacgca aaccaagtgt gcaatgcggt taatctgata 3960
 ccgctcgata ccccgagag gttccgtggt gtttatatga gcatcacccg tctttcggat 4020
 aacgggtatt acaccgttcc tagaagaatg ctggaattca gatcgggtcaa tgcagtggcc 4080
 ttcaacctgc tgggtgacct taggattgac aaggcgatag gccctgggaa gatcatcgac 4140
 aatacagagc aacttcctga ggcaacattt atggtccaca tcgggaactt caggagaaag 4200
 aagagtgaag tctactctgc cgattattgc aaaatgaaaa tcgaaaagat gggcctgggt 4260
 tttgacttg gtgggatagg gggcaccagt cttcacatta gaagcacagg caaatgagc 4320
 aagactctcc atgcacaact cgggttcaag aagaccttat gttaccgct gatggatatc 4380
 aatgaagacc ttaatcgatt actctggagg agcagatgca agatagtaag aatccaggca 4440
 gttttgcagc catcagttcc tcaagaattc cgatttacg acgacgtgat cataaatgat 4500
 gaccaaggac tattcaaagt tctgtagacc gtagtgccca gcaatgcccg aaaacgacct 4560
 cctcacaat gacagccaga agggccggac aaaaaagccc cctccgaaag actccacgga 4620
 ccaagcgaga ggccagccag cagccgacgg caagcgcgaa caccagggcg ccccgacaca 4680
 gaacagccct gacacaaggc caccaccagc caccccaatc tgcatectcc tcgtgggacc 4740
 cccgaggacc aacccccag gctgcccccg atccaaacca ccaaccgcat ccccaccacc 4800
 cccgggaaag aaacccccag caattggaag gccctcccc ctcttctca acacaagaac 4860
 tccacaaccg aaccgcacaa gcgaccgagg tgaccaacc gcaggcatcc gactccctag 4920
 acagatcctc tctccccggc aaactaaaca aaacttaggg ccaaggaaca tacacacca 4980
 acagaacca gacccccggc cacggcgccg cgccccaac ccccgacaac cagagggagc 5040
 cccaaccaa tcccgcggc tccccgggtg cccacaggca gggacaccaa cccccgaaca 5100
 gacccagcac ccaaccatcg acaatccaag acgggggggc cccccaaaa aaaggcccc 5160
 aggggcccag agccagcacc gcgaggaagc ccaccacc caccacgac cacggcaacc 5220
 aaaccagaac ccagaccacc ctgggccacc agctcccaga ctggccatc accccgcaga 5280
 aaggaaaggc cacaaccgc gcaccccagc cccgatccgg cggggagcca cccaaccga 5340
 accagcacc aagagcgatc cccgaaggac cccgaaccg caaaggacat cagtatccca 5400
 cagcctctcc aagtccccg gtctctctct cttctcgaag ggacaaaag atcaatccac 5460

ES 2 686 168 T3

cacacccgac gacactcaac tccccacccc taaaggagac accgggaate ccagaatcaa 5520
gactcatcca atgtccatca tgggtctcaa ggtgaacgtc tctgccatat tcatggcagt 5580
actgttaact ctccaaacac ccaccggtca aatccattgg ggcaatctct ctaagatagg 5640
gggtgtagga ataggaagtg caagctacaa agttatgact cgttccagcc atcaatcatt 5700
agtcataaaa ttaatgccca atataactct cctcaataac tgcacgaggg tagagattgc 5760
agaatacagg agactactga gaacagtttt ggaaccaatt agagatgcac ttaatgcaat 5820
gacccagaat ataagaccgg ttcagagtgt agcttcaagt aggagacaca agagatttgc 5880
gggagtagtc ctggcaggtg cggccctagg cgttgccaca gctgctcaga taacagccgg 5940
cattgcactt caccagtcca tgctgaactc tcaagccatc gacaatctga gagcgagcct 6000
ggaaactact aatcaggcaa ttgagacaat cagacaagca gggcaggaga tgatattggc 6060
tgttcagggg gtccaagact acatcaataa tgagctgata ccgtctatga accaactatc 6120
ttgtgattta atcggccaga agctcgggct caaattgctc agatactata cagaaatcct 6180
gtcattatth ggccccagtt tacgggaccc catatctgcg gagatatcta tccaggcttt 6240
gagctatgcg cttggaggag acatcaataa ggtgttagaa aagctcggat acagtggagg 6300
tgatttactg ggcattctag agagcggagg aataaaggcc cggataactc acgtcgacac 6360
agagtcctac ttcattgtcc tcagtatagc ctatccgacg ctgtccgaga ttaagggggg 6420
gattgtccac cggctagagg ggtctctgta caacataggg tctcaagagt ggtataccac 6480
tgtgcccag tatgttgcaa cccaagggta ccttatctcg aattttgatg agtcatcgtg 6540
tactttcatg ccagagggga ctgtgtgcag ccaaaatgcc ttgtaccca tgagtcctct 6600
gctccaagaa tgctccggg ggtacaccaa gtcctgtgct cgtacactcg tatccggggtc 6660
ttttgggaac cggttcattt tatcacaagg gaacctaata gccaatgtg catcaatcct 6720
ttgcaagtgt tacacaacag gaacgatcat taatcaagac cctgacaaga tccaaacata 6780
cattgctgcc gatcactgcc cggtagtca ggtgaacggc gtgaccatcc aagtcgggag 6840
caggaggat ccagacgctg tgtacttga cagaattgac ctcggtcctc ccatatcatt 6900
ggagagggtg gacgtaggga caaatctggg gaatgcaatt gctaagttgg aggatgcca 6960
ggaattggtg gagtcatcgg accagatatt gaggagtatg aaaggtttat cgagcactag 7020
catagtctac atcctgattg cagtgtgtct tggaggggtg atagggatcc ccgctttaat 7080
atgttgctgc agggggcggt gtaacaaaaa gggagaacaa gttggtatgt caagaccagg 7140
cctaaagcct gatcttacgg gaacatcaaa atcctatgta aggtcgctct gatcctctac 7200
aactcttgaa acacaaatgt cccacaagtc tctcttcgt catcaagcaa ccaccgcacc 7260
cagcatcaag cccacctgaa attatctccg gcttccctct ggccgaacaa tateggtagt 7320
taatcaaaac ttaggggtgca agatcatcca caatgtcacc acaacgagac cggataaatg 7380
ccttctacaa agataacccc catcccagg gaagtaggat agtcattaac agagaacatc 7440
ttatgattga tagacctat gttttgctgg ctgttctggt tgatcatggt ctgagcttga 7500

ES 2 686 168 T3

tcgggttgct agccattgca ggcattagac ttcacgggc agccatctac accgcagaga 7560
 tccataaaag cctcagcacc aatctagatg taactaactc aatcgagcat cagggtcaagg 7620
 acgtgctgac accactcttc aaaatcatcg gtgatgaagt gggcctgagg acacctcaga 7680
 gattcactga cctagtghaa ttaatctctg acaagattaa attccttaat ccggataggg 7740
 agtacgactt cagagatctc acttgggtgta tcaacccgcc agagagaatc aaattggatt 7800
 atgatcaata ctgtgcagat gtggctgctg aagagctcat gaatgcattg gtgaactcaa 7860
 ctctactgga gaccagaaca accaatcagt tcttagctgt ctcaaagggg aactgctcag 7920
 ggcccactac aatcagaggt caattctcaa acatgtcgtc gtccctgtta gacttgtatt 7980
 taggtcgagg ttacaatgtg tcatctatag tcaactatgac atcccagggg atgtatgggg 8040
 gaacttacct agtggaaaag cctaactctga gcagcaaaaag gtcagagttg tcacaactga 8100
 gcatgtaccg agtgtttgaa gtaggtgtta tcagaaatcc gggtttgggg gctccggtgt 8160
 tccatatgac aaactatctt gagcaaccag tcagtaatga tctcagcaac tgtatgggtg 8220
 ctttggggga gctcaaactc gcagcccttt gtcacgggga agattctatc acaattccct 8280
 atcagggatc agggaaaggt gtcagcttcc agctcgtcaa gctaggtgtc tggaaatccc 8340
 caaccgacat gcaatcctgg gtccccttat caacggatga tccagtgata gacaggcttt 8400
 acctctcatc tcacagaggt gttatcgtg acaatcaagc aaaatgggct gtcccgacaa 8460
 cacgaacaga tgacaagttg cgaatggaga catgcttcca acaggcgtgt aagggtaaaa 8520
 tccaagcact ctgagagaat cccgagtgagg caccattgaa ggataacagg attccttcat 8580
 acggggctct gtctgttgat ctgagtctga cagttgagct taaaatcaaa attgcttcgg 8640
 gattcggggc attgatcaca cacggttcag ggatggacct atacaaatcc aaccacaaca 8700
 atgtgtattg gctgactatc ccgccaatga agaacctagc cttaggtgta atcaacacat 8760
 tggagtggat accgagattc aaggttagtc cctacctctt cactgtccca attaaggaag 8820
 caggcgaaga ctgccatgcc ccaacatacc tacctgcgga ggtggatggg gatgtcaaac 8880
 tcagttccaa tctgggtgatt ctacctggtc aagatctcca atatgttttg gcaacctacg 8940
 atacttccag ggttgaacat gctgtggttt attacgttta cagcccaagc cgctcatttt 9000
 cttactttta tccttttagg ttgcctataa agggggctcc catcgaatta caagtggaat 9060
 gcttcacatg ggaccaaaaa ctctggtgcc gtcacttctg tgtgcttgcg gactcagaat 9120
 ctgggtggaca tactactcac tctgggatgg tggcatggg agtcagctgc acagtcaccc 9180
 gggagatgg aaccaatcgc agatagggct gctagtgaac caatcacatg atgtcaccca 9240
 gacatcaggg ataccacta gtgtgaaata gacatcagaa ttaagaaaaa cgtagggctc 9300
 aagtggttcc ccgttatgga ctgctatct gtcaaccaga tcttataccc tgaagttcac 9360
 ctagatagcc cgatagttac caataagata gtagccatcc tggagtatgc tcgagtcctc 9420
 cacgcttaca gcctggagga ccctacactg tgtcagaaca tcaagcaccg cctaaaaaac 9480
 ggattttcca accaatgat tataaacaat gtggaagttg ggaatgtcat caagtccaag 9540

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

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

ES 2 686 168 T3

ttagctaagt ccacagcaact atctatgatt gacctggtaa caaaatttga gaaggaccat 13680
 atgaatgaaa tttcagctct cataggggat gacgatatca atagtttcat aactgagttt 13740
 ctgctcatag agccaagatt attcactatc tacttgggccc agtgtgcggc catcaattgg 13800
 gcatttggatg tacattatca tagaccatca gggaaatatc agatgggtga gctgttgtca 13860
 tcgttccttt ctagaatgag caaaggagtg ttaaagggtc ttgtcaatgc tctaagccac 13920
 ccaaagatct acaagaaatt ctggcattgt ggtattatag agcctatcca tggtccttca 13980
 cttgatgctc aaaacttgca cacaactgtg tgcaacatgg ttacacatg ctatatgacc 14040
 tacctcgacc tgttgttgaa tgaagagtta gaagagtca ctttctctt gtgtgaaagc 14100
 gacgaggatg tagtaccgga cagattcgac aacatccagg caaaacactt atgtgttctg 14160
 gcagatttgt actgtcaacc agggacctgc ccaccaattc gaggtctaag accggtagag 14220
 aatgtgcag ttctaaccga ccatatcaag gcagaggcta tgttatctcc agcaggatct 14280
 tcgtggaaca taaatccaat tattgtagac cttactcat gctctctgac ttatctccgg 14340
 cgaggatcga tcaaacagat aagattgaga gttgatccag gattcatttt cgacgccctc 14400
 gctgaggtaa atgtcagtca gccaaagatc ggagcaaca acatctcaa tatgagcatc 14460
 aaggctttca gacccccaca cgatgatgtt gcaaaattgc tcaaagatat caacacaagc 14520
 aagcacaatc ttcccatttc agggggcaat ctgcccaatt atgaaatcca tgctttccgc 14580
 agaatcgggt tgaactcatc tgcttgctac aaagctgtg agatatcaac attaattagg 14640
 agatgccttg agccagggga ggacggcttg ttcttgggtg agggatcggg ttctatgttg 14700
 atcacttata aagagatact taaactaaac aagtgcctct ataatagtgg ggtttccgcc 14760
 aattctagat ctggtcaaag ggaattagca ccctatccct ccgaagttgg ccttgtcgaa 14820
 cacagaatgg gagtaggtaa tattgtcaaa gtgctcttta acgggaggcc cgaagtcacg 14880
 tgggtaggca gtgtagattg cttcaatttc atagttagta atatccctac ctctagtgtg 14940
 gggtttatcc attcagatat agagacctg cctgacaaaag atactataga gaagctagag 15000
 gaattggcag ccactttatc gatggctctg ctctgggca aaataggatc aatactgggtg 15060
 attaagctta tgcctttcag cggggatttt gttcagggat ttataagtta tgtagggctt 15120
 cattatagag aagtgaacct tgtataacct agatacagca acttcatctc tactgaatct 15180
 tatttgggta tgacagatct caaggctaac cggctaata atcctgaaaa gattaagcag 15240
 cagataattg aatcatctgt gaggacttca cctggactta taggtcacat cctatccatt 15300
 aagcaactaa gctgcataca agcaattgtg ggagacgcag ttagtagagg tgatatcaat 15360
 cctactctga aaaaacttac acctatagag cagggtgctga tcaattgcgg gttggcaatt 15420
 aacggacctt agctgtgcaa agaattgatc caccatgatg ttgcctcagg gcaagatgga 15480
 ttgcttaatt ctatactcat cctctacagg gagttggcaa gattcaaaga caaccaaaaga 15540
 agtcaacaag ggatgttcca cgcttaccct gtattggtaa gtagcaggca acgagaactt 15600
 atatctagga tcacccgcaa attctggggg cacattcttc ttactccgg gaacaaaaag 15660

ES 2 686 168 T3

ttgataaata agtttatcca gaatctcaag tccggctatc tgatactaga cttacaccag 15720
 aatatcttcg ttaagaatct atccaagtca gagaacacaga ttattatgac ggggggtttg 15780
 aaacgtgagt gggtttttaa ggtaacagtc aaggagacca aagaatggta taagttagtc 15840
 ggatacagtg ccttgattaa ggactaattg gttgaactcc ggaaccctaa tctgccccta 15900
 ggtgggttagg cattatttgc aatataattaa agaaaacttt gaaaatacga agtttctatt 15960
 cccagctttg tctggtggcc ggcatgggcc cagcctcctc gctggcgccg gctgggcaac 16020
 attccgaggg gaccgtcccc tcggtaatgg cgaatgggac gcgggcgatc cggctgctaa 16080
 caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc 16140
 ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg 16200
 atgcgggcgc gggccctatg gtaccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattccga 16260
 gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc 16320
 cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaggt 16380
 aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 16440
 agctgcatta atgaatcggc caacgcgcyg ggagagggcg tttgcgtatt gggcgtcttt 16500
 ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag 16560
 ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaagaaca 16620
 tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggtt ctggcgtttt 16680
 tccatagget cggccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 16740
 gaaacccgac aggactataa agataccagg cgttcccccc tggaaagctc ctcgtgcgct 16800
 ctctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 16860
 tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca 16920
 agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact 16980
 atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 17040
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta 17100
 actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct 17160
 tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcggtggtt 17220
 tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 17280
 tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtea 17340
 tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat 17400
 caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg 17460
 cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgcctgactg cccgtcgtgt 17520
 agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgagag 17580
 acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc 17640
 gcagaagtgg tctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 17700

ES 2 686 168 T3

ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca 17760
 tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa 17820
 ggcgagttac atgatcccc atggttgtaa aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga 17880
 tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat gcttatggca gcaactgcata 17940
 attctcttac tgcctatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca 18000
 agtcattctg agaatagtgat atgcccgcac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 18060
 ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtctcat cattggaaaa cgttcttcgg 18120
 ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 18180
 cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag 18240
 gaaggcaaaa tgcgcgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac 18300
 tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcggataca 18360
 tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag 18420
 tgccacctga aattgtaaac gttaatattt tgtaaaatt cgcgtaaat ttttgtaaa 18480
 tcagctcatt ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat ccctataaa tcaaaagaat 18540
 agaccgagat aggggtgagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg 18600
 tggactccaa cgtaaaaggc cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggcca ctactgtaac 18660
 catcaccta atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaaacccta 18720
 aaggagagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag 18780
 ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg 18840
 taaccaccac acccgccgcg cttaatgcdc cgctacaggg cgcgtcccat tcgccattca 18900
 ggctgcgcaa ctggtgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttgctatta cgccagccac 18960
 cgcggtg 18967

5 <210> 19
 <211> 12082
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> plásmido pEMC-LSchw
 <400> 19

aagcttttgc gatcaataaa tggatcacia ccagtatctc ttaacgatgt tcttcgcaga 60
 tgatgattca ttttttaagt atttggctag tcaagatgat gaatcttcat tatctgatat 120
 attgcaaadc actcaatadc tagactttct gttattatta ttgatccaat caaaaaataa 180
 attagaagcc gtgggtcatt gttatgaatc tctttcagag gaatacagac aattgacaaa 240
 attcacagac tttcaagatt ttaaaaaact gtttaacaag gtccttattg ttacagatgg 300
 aagggtcaaa ctttaataaag gatatttgtt cgactttgtg attagtttga tgcgattcaa 360
 aaaagaatcc tctctagcta ccaccgcaat agatcctgtt agatacatag atcctcgtcg 420

ES 2 686 168 T3

caatatcgca ttttctaacg tgatggatat attaaagtcg aataaagtga acaataatta 480
 attcttttatt gtcacatcatga acggcggaca tattcagttg ataatcggcc ccatgttttc 540
 aggtaaaagt acagaattaa ttagacgagt tagacgttat caaatagctc aatataaatg 600
 cgtgactata aatatattcta acgataatag atacggaacg ggactatgga cgcacatgataa 660
 gaataatittt gaagcattgg aagcaactaa actatgtgat gtcttggaaat caattacaga 720
 tttctccgtg ataggtatcg atgaaggaca gttctttcca gacattgttg aattgatctc 780
 gatcccgcga aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagcggg 840
 atcaattccg cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaaat 900
 aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccacat attgccgtct tttggcaatg 960
 tgagggcccc gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttccccctc 1020
 tcgccaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt 1080
 cttgaagaca aacaacgtct gtagcagccc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg 1140
 acaggtgcct ctgcccga aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac 1200
 cccagtgcca cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg 1260
 tattcaacaa ggggctgaag gatgcccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg 1320
 ggcctcgggtg cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc 1380
 gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa aacacgataa taccatggac tcgctatctg 1440
 tcaaccagat cttataccct gaagttcacc tagatagccc gatagttacc aataagatag 1500
 tagccatcct ggagtatgct cgagtccctc acgcttacag cctggaggac cctacactgt 1560
 gtcagaacat caagcaccgc ctaaaaaacg gattttccaa ccaaatgatt ataaacaatg 1620
 tggagttgg gaatgtcatc aagtccaagc ttaggagtta tccggcccac tctcatattc 1680
 catatccaaa ttgtaatcag gatttattta acatagaaga caaagagtca acgaggaaga 1740
 tccgtgaact cctcaaaaag ggaattcgc tgtactccaa agtcagtgat aagggttttc 1800
 aatgcttaag ggacactaac tcacggcttg gcctaggctc cgaattgagg gaggacatca 1860
 aggagaaagt tattaacttg ggagtttaca tgcacagctc ccagtggttt gagccctttc 1920
 tgttttggtt tacagtcaag actgagatga ggtcagtgat taaatcaca acccatactt 1980
 gccataggag gagacacaca cctgtattct tcaactggtag ttcagttgag ttgctaactt 2040
 ctctgacct tgttgctata atcagtaaag agtctcaaca tgtatattac ctgacatttg 2100
 aactggtttt gatgtattgt gatgtcatag aggggaggtt aatgacagag accgctatga 2160
 ctattgatgc taggtataca gagcttctag gaagagtcag atacatgtgg aaactgatag 2220
 atggtttctt ccctgcactc ggaatccaa cttatcaaat tgtagccatg ctggagcctc 2280
 tttcacttgc ttacctgcag ctgagggata taacagtaga actcagaggt gctttcctta 2340
 accactgctt tactgaaata catgatgttc ttgacaaaa cgggttttct gatgaaggta 2400
 cttatcatga gtttaactgaa gctctagatt acattttcat aactgatgac atacatctga 2460

ES 2 686 168 T3

caggggagat tttctcattt ttcagaagtt tcggccaccc cagacttgaa gcagtaacgg 2520
 ctgctgaaaa tgttaggaaa tacatgaatc agcctaaagt catttgttat gagactctga 2580
 tgaaaggcca tgccatattt tgtggaatca taatcaacgg ctatcgtgac aggcacggag 2640
 gcagttggcc accgctgacc ctccccctgc atgctgcaga cacaatccgg aatgctcaag 2700
 cttcaggtga agggttaaca catgagcagt gcgttgataa ctggaaatct tttgctggag 2760
 tgaaatttgg ctgctttatg cctcttagcc tggatagtga tctgacaatg tacctaaagg 2820
 acaaggcact tgctgctctc caaagggaat gggattcagt ttacccgaaa gagttcctgc 2880
 gttacgacct tcccaaggga accgggtcac ggaggcttgt agatgttttc cttaatgatt 2940
 cgagctttga cccatatgat gtgataatgt atgttgtaag tggagcttac ctccatgacc 3000
 ctgagttcaa cctgtcttac agcctgaaag aaaaggagat caaggaaaca ggtagacttt 3060
 ttgctaaaaat gacttacaaa atgagggcat gccaaagtat tgctgaaaat ctaatctcaa 3120
 acgggattgg caaatatfff aaggacaatg ggatggccaa ggatgagcac gatttgacta 3180
 aggcactcca cactctagct gtctcaggag tcccaaaga tctcaaagaa agtcacaggg 3240
 gggggccagt cttaaaaacc tactcccga gcccagtcca cacaagtacc aggaacgtga 3300
 gagcagcaaa agggtttata gggttccctc aagtaattcg gcaggaccaa gacactgatc 3360
 atccggagaa tatggaagct tacgagacag tcagtgcat taccacgact gatctcaaga 3420
 agtactgcct taattggaga tatgagacca tcagcttgtt tgcacagagg ctaaattgaga 3480
 ttacggatt gccctcattt ttccagtggc tgcataagag gcttgagacc tctgtcctgt 3540
 atgtaagtga ccctcattgc cccccgacc ttgacgcca tatcccgta tataaagtcc 3600
 ccaatgatca aatcttcatt aagtacccta tgggaggat agaagggtat tgtcagaagc 3660
 tgtggaccat cagcaccatt ccctatctat acctggctgc ttatgagagc ggagtaagga 3720
 ttgcttcgtt agtgcaagg gacaatcaga ccatagccgt aacaaaaagg gtaccagca 3780
 catggcccta caaccttaag aaacgggaag ctgctagagt aactagagat tactttgtaa 3840
 ttcttaggca aaggctacat gatattggcc atcacctcaa ggcaaatgag acaattgttt 3900
 catcacattt ttttgtctat tcaaaaggaa tatattatga tgggctactt gtgtcccaat 3960
 cactcaagag catcgaaga tigtattct ggtcagagac tatagttgat gaaacaaggg 4020
 cagcatgcag taatattgct acaacaatgg ctaaagcat cgagagagg tatgaccgtt 4080
 acctgcata ttccctgaac gtccataaag tgatacagca aattctgatc tctcttggct 4140
 tcacaatcaa ttcaaccatg acccgggatg tagtcatacc cctcctcaca aacaacgacc 4200
 tcttaataag gatggcactg ttgccgctc ctattggggg gatgaattat ctgaatatga 4260
 gcaggctgtt tgtcagaaac atcgggtgat cagtaacatc atcaattgct gatctcaaga 4320
 gaatgattct cgcctcacta atgcctgaag agaccctcca tcaagtaatg acacaacaac 4380
 cgggggactc ttcattccta gactgggcta gcgaccctta ctgagcaaat cttgtatgtg 4440
 tccagagcat cactagactc ctcaagaaca taactgcaag gtttgcctg atccatagtc 4500

ES 2 686 168 T3

caaacccaat gttaaaagga ttattccatg atgacagtaa agaagaggac gagggactgg 4560
 cggcattcct catggacagg catattatag tacctagggc agctcatgaa atcctggatc 4620
 atagtgtcac aggggcaaga gagtctattg caggcatgct ggataccaca aaaggcttga 4680
 ttcgagccag catgaggaag ggggggttaa cctctcgagt gataaccaga ttgtccaatt 4740
 atgactatga acaattcaga gcagggatgg tgctattgac aggaagaaag agaaatgtcc 4800
 tcattgacaa agagtcatgt tcagtgcagc tggcgagagc tctaagaagc catatgtggg 4860
 cgaggctagc tcgaggacgg cctatttacg gccttgaggc ccctgatgta ctagaatcta 4920
 tgcgaggcca ccttattcgg cgtcatgaga catgtgtcat ctgagagtgt ggatcagtca 4980
 actacggatg gttttttgtc ccctcggggt gccaaactgga tgatattgac aaggaaacat 5040
 catccttgag agtcccatat attggttcta ccaactgatga gagaacagac atgaagcttg 5100
 ccttcgtaag agccccaagt cgatccttgc gatctgctgt tagaatagca acagtgtact 5160
 catgggctta cgggtgatgat gatagctctt ggaacgaagc ctgggttgtg gctaggcaaa 5220
 gggccaatgt gagcctggag gagctaaggg tgatcactcc catctcaact tcgactaatt 5280
 tagcgcatag gttgagggat cgtagcactc aagtgaataa ctgaggtaca tcccttgtcc 5340
 gagtggcgag gtataccaca atctccaacg acaatctctc atttgtcata tcagataaga 5400
 aggttgatac taactttata taccaacaag gaatgcttct agggttgggt gttttagaaa 5460
 cattgtttcg actcgagaaa gataccggat catctaacac ggtattacat cttcacgtcg 5520
 aaacagattg ttgcgtgatc ccgatgatag atcatcccag gatacccagc tcccgcaagc 5580
 tagagctgag ggcagagcta tgtaccaacc cattgatata tgataatgca cttttaattg 5640
 acagagatgc aacaaggcta tacaccaga gccataggag gcaccttgtg gaatttgtta 5700
 catggtccac accccaacta tatcacattt tagctaagtc cacagcacta tctatgattg 5760
 acctggtaac aaaatttgag aaggaccata tgaatgaaat ttcagctctc ataggggatg 5820
 acgatatcaa tagtttcata actgagttc tgctcataga gccaaagatta ttcactatct 5880
 acttgggcca gtgtgcggcc atcaattggg catttgatgt acattatcat agaccatcag 5940
 ggaaatatca gatgggtgag ctggtgtcat cgttccttct tagaatgagc aaaggagtgt 6000
 ttaaggtgct tgtcaatgct ctaagccacc caaagatcta caagaaattc tggcattgtg 6060
 gtattataga gcctatccat ggtccttcac ttgatgctca aaacttgcac acaactgtgt 6120
 gcaacatggt ttacacatgc tatatgacct acctcgacct gttggtgaat gaagagttag 6180
 aagagttcac atttctcttg tgtgaaagcg acgaggatgt agtaccggac agattcgaca 6240
 acatccaggc aaaacactta tgtgttctgg cagatttgta ctgtcaacca gggacctgcc 6300
 caccaattcg aggtctaaga ccggtagaga aatgtgcagt tctaaccgac catatcaagg 6360
 cagaggctat gttatctcca gcaggatctt cgtggaacat aaatccaatt attgtagacc 6420
 attactcatg ctctctgact tatctccggc gaggatcgat caaacagata agattgagag 6480
 ttgatccagg attcatttct gacgccctcg ctgaggtaaa tgtcagtcag ccaaagatcg 6540

ES 2 686 168 T3

gcagcaacaa catctcaa atgagcatca aggccttcag acccccacac gatgatgttg 6600
caaaattgct caaagatata aacacaagca agcacaatct tcccatttca gggggcaatc 6660
tcgccaatta tgaaatccat gctttccgca gaatcgggtt gaactcatct gcttgctaca 6720
aagctgttga gatatcaaca ttaattagga gatgccttga gccaggggag gacggcctgt 6780
tcttgggtga gggatcgggt tctatgttga tcacttataa agagatactt aactaaaca 6840
agtgccttcta taatagtggg gttccgcca attctagatc tggcacaagg gaattagcac 6900
cctatccctc cgaagtggc cttgtcgaac acagaatggg agtaggtaat attgtcaaag 6960
tgctctttaa cgggaggccc gaagtcacgt gggtaggcag tgtagattgc ttcaatttca 7020
tagttagtaa tatccctacc tctagtgtgg ggtttatcca ttcagatata gagaccttgc 7080
ctgacaaaga tactatagag aagctagagg aattggcagc catcttatcg atggctctgc 7140
tcctgggcaa aataggatca atactgggtga ttaagcttat gccttcagc ggggattttg 7200
ttcagggatt tataagttat gtagggctc attatagaga agtgaacctt gtatacccta 7260
gatacagcaa cttcatctct actgaatctt atttggttat gacagatctc aaggctaacc 7320
ggctaataaa tcctgaaaag attaagcagc agataattga atcatctgtg aggacttcac 7380
ctggacttat aggtcacatc ctatccatta agcaactaag ctgcatacaa gcaattgtgg 7440
gagacgcagt tagtagaggt gatatcaatc ctactctgaa aaaacttaca cctatagagc 7500
aggtgctgat caattgcggg ttggcaatta acggacctaa gctgtgcaaa gaattgatcc 7560
accatgatgt tgccctcagg caagatggat tgcttaattc tatactcatc ctctacaggg 7620
agttggcaag attcaaagac aaccaaagaa gtcaacaagg gatgttcac gcttaccctg 7680
tattggtgag tagcaggcaa cgagaactta tatctaggat caccgcaaa ttctgggggc 7740
acattcttct ttactccggg aacaaaaagt tgataaataa gtttatccag aatctcaagt 7800
ccggctatct gatactagac ttacaccaga atatcttctg taagaatcta tccaagtcag 7860
agaaacagat tattatgacg gggggtttga aacgtgagtg ggtttttaag gtaacagtca 7920
aggagaccaa agaatgggtat aagttagtcg gatacagtc cctgattaag gactaattgg 7980
ttgaactccg gaacccta atctgacctag gtggttaggc attatctacc tcgagggggc 8040
cggatccact agttctagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8100
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa acgtcgcgca ggtgacaatg tcgagctagc tatgaattcc 8160
ccggggagct cactagtggg tccctgcagc tcgagaggcc taattaatta agtcgacgat 8220
ccggctgcta acaaagccc aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa 8280
ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga 8340
actatatccg gatcagatc aattctgtga gcgtatggca aacgaaggaa aatagttat 8400
agtagccgca ctcgatggga catttcaacg taaaccgttt aataatattt tgaatcttat 8460
tccattatct gaaatgggtg taaaactaac tgctgtgtgt atgaaatgct ttaaggaggc 8520
ttccttttct aaacgattgg gtgaggaaac cgagatagaa ataataggag gtaatgatat 8580

ES 2 686 168 T3

gtatcaatcg gtgtgtagaa agtgttacat cgactcataa tattatattt tttatctaaa 8640
 aaactaaaa taaacattga ttaaatttta atataatact taaaaatgga tgttggtcgc 8700
 ttagataaac cgtttatgta ttttgaggaa attgataatg agttagatta cgaaccagaa 8760
 agtgcaaatg aggtcgcaaa aaaactgccg tatcaaggac agttaaact attactagga 8820
 gaattatttt ttcttagtaa gttacagcga cacgggtatat tagatggtgc caccgtagtg 8880
 tatataggat ctgctcccgg tacacatata cgttatttga gagatcattt ctataattta 8940
 ggagtgatca tcaaatggat gctaattgac ggccgccatc atgatcctat tttaaatgga 9000
 ttgctgatg tgactctagt gactcggttc gttgatgagg aatatctacg atccatcaaa 9060
 aaacaactgc atccttctaa gattatttta atttctgatg tgagatcaa acgaggagga 9120
 aatgaaccta gtacggcggg tttactaagt aattacgctc tacaaaatgt catgattagt 9180
 attttaaacc ccgtggcgtc tagtcttaa tggagatgcc cgttccaga tcaatggatc 9240
 aaggactttt atatcccaca cggaataaa atgttacaac cttttgctcc ttcatattca 9300
 gggccgtcgt tttaacaact cggtactggg aaaaccctgg cgttaccaa cttaatcgcc 9360
 ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc 9420
 cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcga cgcgccctgt agcggcgcac 9480
 taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag 9540
 cgcccgtcc tttcgtttc ttcccttct tctcgcac gttcgcggc tttccccgtc 9600
 aagctctaaa tcgggggctc ctttagggg tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc 9660
 ccaaaaaact tgattagggg gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt 9720
 ttcgcccttt gacgttgagg tccacgttct ttaatagtgg actcttggtc caaactggaa 9780
 caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg 9840
 cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat 9900
 taacgtttac aatttccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 9960
 tttattttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 10020
 gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 10080
 tcccttttt gcggcatttt gccttctgt ttttctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 10140
 aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 10200
 cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa 10260
 agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 10320
 ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 10380
 tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgtcc ataaccatga gtgataacac 10440
 tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 10500
 caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcggtgggaa ccggagctga atgaagccat 10560
 accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaactg tgcgcaact 10620

ES 2 686 168 T3

attaactggc gaactactta ctctagcttc cggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 10680
 ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga 10740
 taaatctgga gccgggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg 10800
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 10860
 aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca 10920
 agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 10980
 ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 11040
 ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcy 11100
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 11160
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 11220
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 11280
 tacatacctc gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 11340
 tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac 11400
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 11460
 acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggatatt 11520
 ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg 11580
 gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 11640
 ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 11700
 ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgcy ttatcccctg attctgtgga 11760
 taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg 11820
 cagcagatca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc 11880
 gcggttgccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggagc 11940
 tgagcgaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt 12000
 tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc acacaggaaa 12060
 cagctatgac catgattacg cc 12082

5 <210> 20
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador AttB1-T7Pol
 <400> 20

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc caccatggaa ttctctgaca tcgaactggc 60
 t 61

15 <210> 21.
 <221> 64
 <212> ADN

ES 2 686 168 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador AttB2-retourT7Pol
 5 <400> 21
ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt atcacgCGaa cgcgaagtcc gactctaaga 60
tgtc 64
 10 <210> 22
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador AttBI-SV40nls
 <400> 22
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc caccatggca ccaaaaaaga agagaaaggt 60
 20 **a 61**
 <210> 23
 <211> 58
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador AttB1-N
 30 <400> 23
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc catggccaca ctttaagga gcttagca 58
 35 <210> 24
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador AttB2-N
 <400> 24
gggaccactt tgtacaagaa agctgggtgt gtactagtct agaagatttc tgcattgta 60
 45 <210> 25
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador AttB1-P
 <400> 25
 55 **ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc catggcagaa gagcaggcac gccat 55**
 <210> 26
 <211> 68
 <212> ADN

ES 2 686 168 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cebador AttB2-P

5

<400> 26

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ttactacttc attattatct tcatcagcat 60

ctggtgga 68

REIVINDICACIONES

1. Una célula recombinante que comprende integrados en su genoma al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), al menos una copia de un ácido nucleico que
 5 codifica una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos, y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con dicho ácido o ácidos nucleicos y donde dicha ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), dichas proteínas N y P se expresan de manera estable,
 10 y donde dichos derivados funcionales de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) y/o la nucleoproteína (N) y/o la fosfoproteína (P) se definen como variantes de la ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) y/o de la proteína N y/o de la proteína P que mantienen actividad de la proteína a partir de la cual se obtienen, como un complejo de ribonucleoproteína (complejo RNP), funcional en transcripción y replicación en un genoma de virus, en un sistema de rescate que posibilita la producción de virus de ARN de cadena de sentido
 15 negativo no segmentada a partir de ADNc clonado, estando dichas variantes codificadas por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad (solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación del 50 % de formamida, 20 6X SSC a 42° C y condiciones de lavado a 68° C, 0,2X SSC y el 0,1 % de SDS) con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 y la proteína P de SEQ ID NO: 15 de una cepa o virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada;
 b) un ácido nucleico que presenta al menos el 80 %, preferentemente el 90 %, más preferentemente el 95 % o incluso el 99 % de similitud con un ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de
 25 SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 o la proteína P de SEQ ID NO: 15, calculándose dicha similitud a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias; y
 c) un ácido nucleico que difiere del ácido nucleico que codifica la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 o la proteína P de
 30 SEQ ID NO: 15 en al menos un nucleótido, opcionalmente sustitución conservativa, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, en al menos una supresión o adición de nucleótido, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 supresiones o adiciones de nucleótido;

o, siendo un fragmento que representa al menos el 70 %, particularmente el 80 % y más particularmente el 90 % o incluso el 95 % de la ARN polimerasa del fago T7 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 o su forma nuclear (nlsT7) de
 35 SEQ ID NO: 11, la proteína N de SEQ ID NO: 13 o la proteína P de SEQ ID NO: 15.

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

40 a. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) bajo el control de elemento o elementos reguladores de transcripción,
 b. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de elemento o elementos reguladores de transcripción, y
 45 c. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de elemento o elementos reguladores de transcripción.

3. Una célula recombinante que comprende integrada en su genoma, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), al menos una copia de un ácido nucleico que
 50 codifica una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1, y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con dicho ácido o ácidos nucleicos y donde dicha ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), dichas proteínas N y P se expresan de una manera estable, y siendo obtenible dicha célula recombinante por recombinación de su genoma con:

55 a. un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7),
 b. un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, y
 60 c. un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

4. Una célula recombinante que comprende integrada en su genoma, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), al menos una copia de un ácido nucleico que
 65 codifica una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una fosfoproteína (P) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no

segmentada o derivados funcionales de los mismos como se define en la reivindicación 1, y al menos una copia de un ADN solapado asociado funcionalmente con dicho ácido o ácidos nucleicos y donde dicha ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlST7), dichas proteínas N y P se expresan de una manera estable, y siendo obtenible dicha célula recombinante por recombinación de su genoma con un vector de expresión que comprende:

- 5
- a. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlST7).
 - b. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de sentido negativo no segmentada.
 - 10 c. al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y
 - d. un ADN solapado.

15 5. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las proteínas N y P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son del mismo virus, preferentemente de la misma cepa de virus o de diferentes cepas de virus o son de diferentes virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

20 6. Una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, donde las proteínas N y P de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son de un virus MV atenuado, particularmente cepa Schwarz MV.

25 7. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el ADN solapado se obtiene a partir de un lentivirus, tal como un virus CAEV, EIAV, VISNA, SIV o FIV, particularmente un lentivirus humano, tal como VIH preferentemente VIH-1 o VIH-2.

8. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde dicho vector o vectores es o son vector o vectores de gen de transferencia derivados de VIH que comprenden dos LTR, uno de los LTR estando opcionalmente eliminado en la parte U3, y elementos reguladores de la expresión y la transcripción.

30 9. Una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 3 o una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde los vectores son:

- 35
- a. el plásmido HIV-1-TRIP Δ U3.CMV-T7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3702 o el plásmido HIV-1-TRIP Δ U3.CMV-nlST7, depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3703.
 - b. el plásmido HIV-1-TRIP Δ U3.CMV-N depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3700, y
 - c. el plásmido HIV-1-TRIP Δ U3.CMV-P depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3701.
- 40

10. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 la cual es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, más preferentemente una célula humana.

45 11. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que puede dividirse o que no se puede dividir.

50 12. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 la cual es una célula HEK 293 (riñón embrionario humano), en particular la línea de células 293-T7-NP depositada en el CNCM el 14 de junio de 2006 con el número I-3618 o la línea de células 293-nlST7-NP MV depositada en el CNCM el 4 de agosto de 2006, con el número I-3662.

55 13. Una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende integrada en su genoma al menos una copia de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, opcionalmente bajo el control de elementos reguladores de transcripción.

60 14. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, recombinada adicionalmente por un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tal como el plásmido pEMC-LSchw depositado en el CNCM el 18 de diciembre de 2007, con el número I-3881.

65 15. Una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 14, donde el vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.

16. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, donde las proteínas N, P y L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada son del mismo virus, en particular de la misma cepa de virus o de cepas de virus diferentes, o son de diferentes virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada.
- 5 17. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, donde la proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus MV, particularmente de una cepa Schwarz MV.
- 10 18. Una célula recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, recombinada adicionalmente con un clon de ADNc que codifica el antígeno de longitud completa de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, opcionalmente modificado mediante inserción en lugar o lugares permisivos de ácido o ácidos nucleicos heterólogos.
- 15 19. Un cultivo celular que está compuesto de células recombinantes como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en particular un cultivo primario o una línea celular.
20. Un vector de expresión derivado de retroviral, en particular un plásmido, que contiene un ADN solapado y al menos un ácido nucleico que codifica una proteína que se selecciona del grupo que consiste en una polimerasa de ARN del fago T7 o su forma nuclear (nlst7), una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativa no segmentada, una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativa no segmentada y una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativa no segmentada.
- 20 21. Un vector de expresión derivado de retroviral de acuerdo con la reivindicación 20 que es un vector derivado de FIV o SIF, un lentivirus humano tal como un vector derivado de VIH, preferentemente un vector derivado de VIH-1 o VIH-2.
- 25 22. Un vector de expresión derivado de retroviral de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 elegido en el grupo que consiste en:
- 30 a) un vector que comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7, tal como el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-T7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3702;
- b) un vector que comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una forma nuclear de una ARN polimerasa del fago T7, tal como el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-nlst7 depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3703;
- 35 c) un vector que comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tal como el HIV-1-TRIPΔU3.CMV-N depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006 con el número I-3700;
- 40 d) un vector que comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tal como el plásmido HIV-1-TRIPΔU3.CMV-P depositado en el CNCM el 14 de diciembre de 2006, con el número I-3701;
- e) un vector que comprende un ADN solapado y un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena negativa no segmentada;
- 45 f) un vector que comprende un ADN solapado y un ácido o ácidos nucleicos que codifican una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlst7), una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y opcionalmente una proteína L de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada; y
- 50 g) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína L de un virus de ARN de cadena negativa no segmentada, que es el plásmido pEMC-LSchw, depositado en el CNCM el 18 de diciembre de 2007, bajo el número I-3881.
23. Un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde dicho ácido nucleico está bajo el control de elemento o elementos reguladores de la transcripción, tales como un promotor, por ejemplo el promotor CMV.
- 55 24. Método para producir virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante que se elige en el o consiste en:
- 60 (i) un método que comprende o que consiste en:
- a. recombinar adicionalmente el genoma de una célula recombinante o un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en particular la línea celular 293-T7-NP depositada en el CNCM el 14 de junio de 2006 con el número I-3618 o la línea de células 293-nlst7-NP MV depositada en el CNCM el 4 de agosto de 2006, con el número I-3662, con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada y con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga
- 65

de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada,

b. transferir dicha célula recombinante o cultivo de células recombinantes a células con capacidad para mantener la replicación y producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tales como células Vero (células de riñón de mono verde africano), células CEF (fibroblasto de embrión de gallina) o células MRC5 y

c. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, infeccioso, recombinante a partir del co-cultivo de la etapa b;

(ii) un método que comprende o consiste en:

a. recombinar adicionalmente el genoma de una célula recombinante o un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada y

b. transferir dicha célula recombinante o cultivo de células recombinantes a células con capacidad para mantener la replicación y producción de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, tales como células Vero (células de riñón de mono verde africano), células CEF (fibroblasto embrionario de pollo) o células MRC5 y

c. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir del co-cultivo de la etapa b;

(iii) un método que comprende o consiste en:

a. recombinar adicionalmente el genoma de una célula recombinante o un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en particular un cultivo de células eucariotas, más particularmente un cultivo de células de mamífero o un cultivo de células humanas tales como fibroblastos humanos, especialmente la línea celular MRC5 (fibroblastos de pulmón humanos), con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y

b. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de la célula recombinante o cultivo de células recombinantes; y

(iv) un método que comprende o consiste en:

a. recombinar adicionalmente el genoma de una célula recombinante o de un cultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, particular un cultivo de células eucariotas, más particularmente un cultivo de células de mamífero o un cultivo de células humanas tales como fibroblastos humanos, especialmente la línea celular MRC5 (fibroblastos de pulmón humanos), con un clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada; y

b. recuperar el virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada infeccioso, recombinante a partir de la célula recombinante o cultivo de células recombinantes.

25. Método de acuerdo con la reivindicación 24, donde la secuencia de nucleótidos de dicho clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada se modifica mediante inserción, en lugares permisivos, de al menos un ácido o ácidos nucleicos heterólogos tales como un ácido nucleico heterólogo que codifica epítopos o poliepitopos.

26. Método de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, donde dicho clon de ADNc de cadena de sentido negativo no segmentada modificado de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada es de un virus MV atenuado, particularmente la cepa MV Schwarz.

27. Método para producir células recombinantes elegidas en el grupo que consiste en:

(i) un método para producir células recombinantes como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende o que consiste en:

a. recombinar el genoma de una célula con al menos:

- un vector de expresión que comprende un ADN solapado y al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7),

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

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

- 5 b. seleccionar las células que producen de forma estable, a partir de ácido o ácidos nucleicos recombinados con su genoma, al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, o derivados funcionales de las mismas como se define en la reivindicación 1;
- (ii) un método para producir células recombinantes como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende o que consiste en:
- 10 a. recombinar el genoma de una célula con al menos un vector de expresión que comprende
- al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7) bajo el control de un promotor,
 - 15 - al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína N de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de un promotor,
 - al menos una copia de un ácido nucleico que codifica una proteína P de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada bajo el control de un promotor y
 - un ADN solapado y
- 20 b. seleccionar las células que producen de forma estable, a partir de ácido o ácidos nucleicos recombinados con su genoma, al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada, o derivados funcionales de las mismas como se define en la reivindicación 1; y
- 25 (iii) un método para producir células recombinantes como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 que comprende o que consiste en:
- a. proporcionar células recombinantes por un método de acuerdo con la opción (i) o (ii) anterior,
 - 30 b. recombinar adicionalmente el genoma de las células recombinantes obtenidas en a. con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína larga de ARN polimerasa (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y
 - c. seleccionar las células que producen de forma estable al menos una ARN polimerasa del fago T7 o su forma nuclear (nlsT7), una nucleoproteína (N) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y una fosfoproteína (P) de virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada y que
 - 35 producen una proteína larga (L) de un virus de ARN de cadena de sentido negativo no segmentada o derivados funcionales de las mismas como se define en la reivindicación 1.

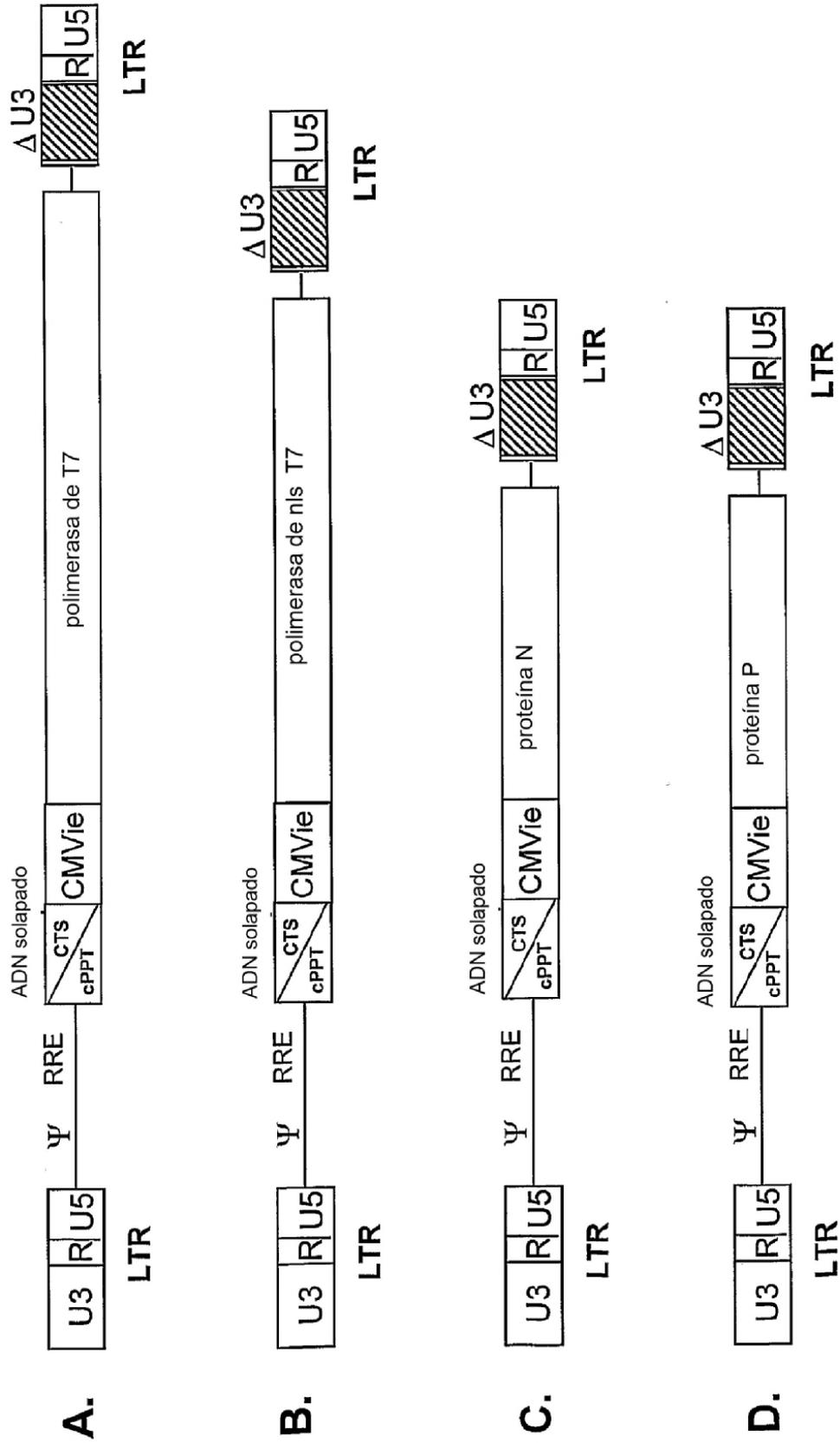


Fig. 1

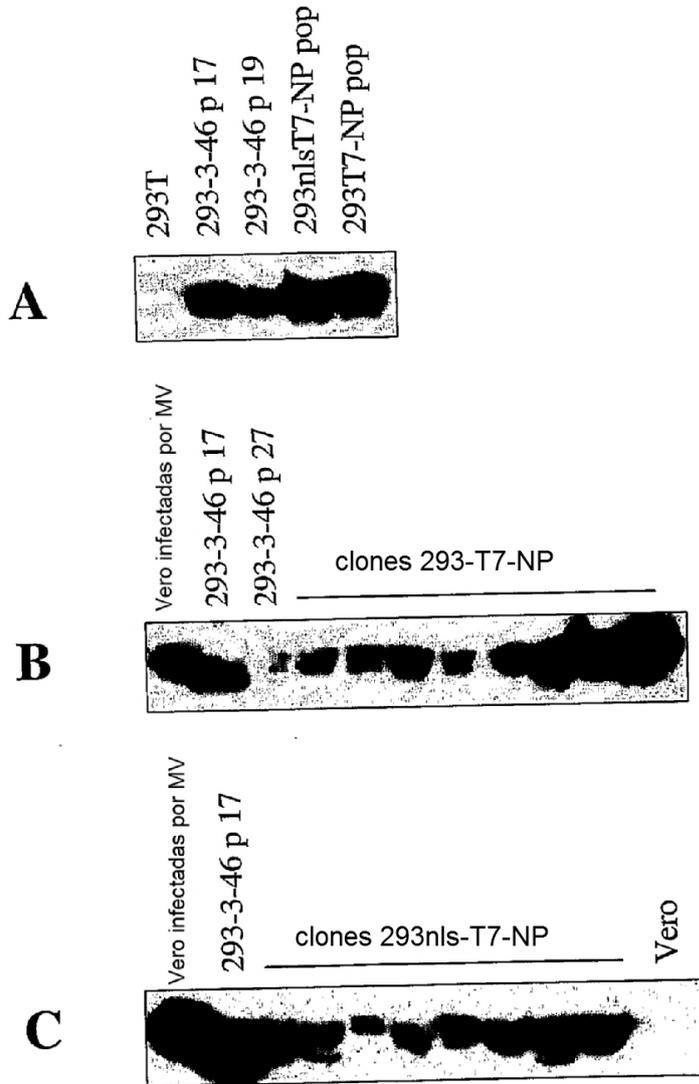


Fig. 2