

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 349 970**

21 Número de solicitud: 200803224

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **11.11.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**13.01.2011**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 34 %)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área Temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)**, (Titular al 25 %)  
**Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)** (Titular al 31 %) y  
**Universidad de Castilla-La Mancha** (Titular al 10 %)

72 Inventor/es: **Mena Piñero, Ignacio;**  
**Gómez Castilla, Jordi;**  
**Toledano Díaz, Rosa y**  
**Sabariegos Jareño, María Rosario**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de la RNasa P como agente antiviral.**

57 Resumen:

Uso de la RNasa P como agente antiviral.  
Uso de la RNasa P de *Synechocystis* sp. para inhibir la replicación de virus de RNA, y para la elaboración de medicamentos para el tratamiento de enfermedades provocadas por virus de RNA.

ES 2 349 970 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de la RNasa P como agente antiviral.

5 La presente invención pertenece al campo de la biología, biología molecular y la medicina, y en concreto se refiere al uso de la RNasa P para inhibir la replicación de virus de RNA, y para la elaboración de medicamentos para el tratamiento de enfermedades provocadas por virus de RNA.

## Estado de la técnica anterior

10 Las ribozimas (de *ribonucleic acid enzyme*), llamadas también enzimas de RNA ó RNA catalítico, son moléculas de RNA que catalizan reacciones químicas.

15 Fue durante los años 80 cuando se describió que el RNA podía presentar actividad catalítica. Inicialmente se detectó que era capaz de catalizar reacciones de procesamiento del RNA y más tarde esta propiedad catalítica se extendió a un buen número de reacciones bioquímicas distintas. Una de las dos primeras descripciones de reacciones catalizadas por RNA y por la que recibió el premio Nobel de química el Prof. Sydney Altman, fue la llevada a cabo por el RNA de la actividad RNasa P.

20 La RNasa P es una endonucleasa que se encuentra presente en todos los organismos vivos (*Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea*). Lleva a cabo una reacción enzimática simple, la hidrólisis de un puente fosfodiéster específico en los precursores del tRNA (pre-tRNA). Procesa el precursor del tRNA en la terminación 5' dando lugar a la forma madura del tRNA. En *E. coli* la responsable de la actividad natural es una ribonucleoproteína compuesta por una subunidad proteica, y otra de RNA. A la parte de RNA se le llamó M1. Se demostró *in vitro*, que la actividad catalítica residía en el RNA, mientras que la parte proteica no era necesaria, y simplemente podía ser sustituida por una mayor concentración de sales en la reacción (Altman 1989. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 62: 1-36).

25 Posteriormente se valoró el potencial terapéutico de esta molécula evaluando si podía ser dirigida específicamente contra un RNA patógeno: RNAs víricos, de oncogenes, o de resistencia a antibióticos en bacterias. Para eso, se diseñaron construcciones derivadas de la ribozima M1 adicionando a ésta lo que se vino a denominar como secuencias guía. Estas secuencias guía son secuencias cortas (~12 bases) que se unen covalentemente al extremo 3' RNA de M1 y que son complementarias al RNA patógeno (Altman 1995. *Biotechnology (N Y)* 13, 327-329). La hibridación de la secuencia guía con el RNA patógeno aproxima a este a la ribozima M1, que acaba provocando su procesamiento e inactivación (Liu & Altman, 1995. *Genes & Dev.* 9: 471-480).

35 Generalmente, los virus de RNA presentan tasas de mutación muy elevadas, y por tanto un alto grado de variabilidad genética. Esto sucede porque las ARN polimerasas carecen -a diferencia de las ADN polimerasas- de sistema que puedan detectar y corregir los errores (reparación del ARN). Los virus de RNA, gracias a la velocidad con que se replican, explotan la variación genética como un mecanismo para escapar de la presión de selección del sistema inmune de sus huéspedes, o de fármacos antivirales, que intentan impedir su replicación. Es casi inevitable que cuando se ataca a una población de virus con un fármaco antiviral, surja una mutación que confiere resistencia al fármaco. Los virus resistentes prosperan y se replican en gran número, para después diseminarse. Con el tiempo, los virus resistentes terminan por predominar y un fármaco antiviral que solía dar buenos resultados pierde su eficacia. Los individuos afectados por este tipo de virus, incluso aquellos que no han recibido nunca tratamiento, pueden tener una variedad de virus ("quasiespecies") entre los que se encuentran aquellas variantes que no responden del mismo modo al tratamiento. Así, las estrategias tradicionales de prevención y tratamiento de afecciones virales se están haciendo obsoletas, hasta el punto de que no existen vacunas o agentes antivirales para muchas enfermedades virales en animales y humanos.

50 En 2002 se demostró (Nadal *et al.*, 2002. *J Biol Chem* 277: 30606-30613) que la RNasa P humana, un complejo de al menos 9 proteínas y un RNA eran capaces de reconocer y cortar *in vitro* el RNA del virus de la hepatitis C de forma específica en dos regiones, una de ellas justo en la entrada interna del ribosoma (IRES de *internal ribosome entry site*) de HCV, una región que es esencial para la reproducción vírica.

55 Utilizando modelos en cultivo se obtuvieron evidencias de que esta reacción no forma parte del ciclo viral (Pirón *et al.*, 2005. *Nucleic Acids Res* 33: 1487-1502), probablemente porque la actividad RNasa P reside en el núcleo, mientras que el virus se reproduce en el citoplasma. La detección de la sensibilidad a la RNasa P humana se generalizó a los pestivirus animales (Lyons & Robertson, 2003. *J Biol Chem* 278, 26844-26850), picornavirus (Serrano *et al.*, 2007. *RNA* 13:849-859) y a otro virus de insectos.

60 Esto permitía pensar que un RNA catalítico derivado de alguna bacteria e introducido en el interior celular podría cortar *in vivo* el RNA del virus de la hepatitis C o de los pestivirus animales relacionados. Sin embargo, pruebas posteriores mostraron la incapacidad de la ribozima de M1 de *E. coli* para procesar el RNA de HCV en el IRES, pero encontramos que el RNA (RNasa P) catalítico de la cianobacteria *Synechocystis* sp., si era capaz de procesarlo específicamente *in vitro* (Sabariego *et al.*, 2002. *FEBS Lett* 577: 517-522).

## Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han observado que la ribozima de la cianobacteria (*Synechocystis* sp.) que se había mostrado activa contra el RNA de hepatitis C *in vitro* también lo es contra el RNA de los pestivirus animales relacionados peste porcina clásica (PPC) y diarrea viral bovina (BVDV) *in vitro*. Esto les ha permitido ensayar la actividad de la ribozima natural contra el IRES del virus de la peste porcina clásica *in vivo*, demostrando la actividad de la ribozima en el interior celular inhibiendo la reproducción viral, y que esta inhibición viral no se debe a ningún efecto inespecífico de inhibición del metabolismo celular por la introducción del RNA. Esto supone una serie de ventajas clave respecto a la tecnología preexistente:

1- *no es necesario modificar la secuencia natural de un ribozima*, para que este sea activo en el interior celular contra un virus de RNA,

2- la RNasa P reconoce estructuras miméticas al tRNA en sus RNAs sustrato. La RNasa P reconoce todos los tRNAs celulares, independientemente de las variaciones de secuencia de estos. Incluso se ha demostrado que la RNasa P humana puede reconocer tRNAs bacterianos y viceversa. Es decir, la actividad de la RNasa P *es independiente de la variación de la secuencia de bases que conforman la estructura del RNA sustrato, siempre que este mantenga una estructura mimética al tRNA*. Incluso se ha observado que variaciones en las posiciones adyacentes al punto de corte en el caso del RNA de hepatitis C no afectan a la actividad. Esta propiedad minimiza el efecto de la enorme variabilidad que presentan estos virus y que les permite evadir cualquier droga, ya que es posible postular que, aquellas mutaciones que modificasen la estructura de tipo tRNA para evadir la actividad del ribozima, supondrían también una pérdida de su función biológica.

Por tanto, un primer aspecto de esta invención se refiere al uso de una secuencia nucleotídica, de ahora en adelante secuencia nucleotídica de la invención, que se selecciona de entre:

a) moléculas de ácido nucleíco que comprenden la SEQ ID NO: 1, ó

b) moléculas de ácido nucleíco cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a), para inhibir la replicación de virus de RNA.

La SEQ ID NO: 1 recoge la secuencia de nucleótidos de la ribozima RNAasa P aislada de la especie *Synechocystis* sp. del Superreino *Bacteria*, Phylum *Cyanobacteria*, Orden *Chroococcales*.

Cuando se compara la secuencia de la RNasa P (de *Synechocystis* sp.) con la secuencia de otras RNAasa P aisladas en otras especies, es evidente que existen ciertas regiones que están más conservadas que otras. Esta información puede ser indicativa de que esas zonas son cruciales para mantener la estructura o función de la ribozima. Al estudiar la estructura secundaria de las RNAsas P bacterianas se han reconocido dos tipos estructurales distintos (tipo A y tipo B). El tipo A es la forma ancestral, mientras que el tipo B emergió posteriormente con el linaje Gram positivo. El RNasa P se organiza en dominios estructurales: el dominio I, involucrado en el reconocimiento de la T-loop de los pre-tRNAs, y que forma la parte "superior" de la RNasa P, y el Dominio II, que incluye la mitad "inferior" y que comprende la mayoría de los nucleótidos que parecen involucrados en la formación del sitio catalítico.

Por tanto las regiones activas que determina la especificidad de las RNAsas P conservadas importantes para la actividad de la ribozima, estarán más conservadas entre distintas RNAsas P, mientras que en otras regiones la divergencia será mayor. Se han propuesto estructuras consenso (Massire *et al.*, 1998. *JMB* 279: 773-793).

Así pues, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un fragmento de la secuencia de ácidos nucleícos SEQ ID NO: 1, que posee la actividad catalítica de la ribozima RNAasa P de *Synechocystis* sp., para inhibir la replicación de los virus de RNA.

Además, por todo lo dicho anteriormente, puede esperarse que la identidad global de las RNAsas P homologas a la RNasa P aislada de la especie *Synechocystis* sp., a nivel de la secuencia nucleotídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1, sea de un 70% o mayor, y más preferiblemente de un 80% o mayor y más preferiblemente de un 90, o un 95% o mayor. La correspondencia entre la secuencia nucleotídica de la(s) RNasa(s) P putativa(s) y la secuencia de otras RNAsas P se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia nucleotídica procedente de la RNasa P homologa putativa, y la secuencia nucleotídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1 de esta memoria.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos de RNasa P presenta una identidad de, al menos, un 70% con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos de un 80%, más preferiblemente al menos de un 90% y aún más preferiblemente al menos de un 95%.

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos. Puesto que dos secuencias se consideran homologas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen

## ES 2 349 970 A1

función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 70% indicarían homología. Podemos considerar por tanto que porcentajes de identidad de al menos un 80% mantendrán la función RNAasa P de dicha secuencia.

5 El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)). Adicionalmente, el algoritmo de Smith  
10 Waterman debe usarse para determinar el grado de identidad de dos secuencias.

El término “fragmento” ó “derivado” de una secuencia “que posea la actividad catalítica de la RNAasa P”, se refiere a fragmentos derivados de la RNAasa P de *Synechocystis* sp en su estado natural que carecen de algún o algunos nucleótidos, y que aún actúan inhibiendo la replicación de los virus de RNA. Alternativamente este término  
15 también se refiere a secuencias derivadas de la RNAasa P de *Synechocystis* sp. natural, donde se ha cambiado uno o más nucleótidos, se han eliminado, o añadidos, y/o que hayan sufrido inversiones o duplicaciones. Tales modificaciones se hacen preferentemente mediante tecnología recombinante. También pueden hacerse otras modificaciones mediante alteraciones químicas de la RNasa P. La secuencia resultante (o los fragmentos derivados del mismo) pueden ser  
20 producidos recombinantemente, y retener características idénticas, o esencialmente idénticas a la RNasa P natural de *Synechocystis* sp.

En esta memoria se entiende por “virus de RNA” ó “virus de ARN” a un virus que usa ácido ribonucleico (RNA) como material genético, o bien que en su proceso de replicación necesita el RNA. Por ejemplo, el virus de la Hepatitis B es un virus clasificado como virus RNA, aunque su genoma es ADN de doble cadena, ya que el genoma es transcrito  
25 en RNA durante la replicación. Su ácido nucleico es usualmente RNA monocatenario pero también puede ser RNA bicatenario. Los virus RNA monocatenarios pueden clasificarse, según el sentido o polaridad de su RNA en negativos o positivos. Los virus RNA positivos son idénticos al RNA mensajero (RNAm) viral y por lo tanto pueden ser inmediatamente traducidos por la célula huésped. El RNA viral negativo es complementario del RNAm y por lo tanto debe convertirse en RNA positivo por una RNA polimerasa antes de la traducción.

30 Los retrovirus, al contrario que otros virus RNA monocatenarios, usan ADN intermedio para replicarse. La transcriptasa inversa, una enzima viral procedente del propio virus, convierte el RNA viral en una cadena complementaria de DNA, que se copia para producir una molécula de ADN bicatenario viral. Este DNA dirige la formación de nuevos viriones.

35 Los virus ARN pertenecen a los grupos III-VII de la Clasificación de Baltimore.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, los virus de RNA cuya replicación es inhibida por la secuencia de nucleótidos de la invención pertenecen a los grupos III-VII de la Clasificación de Baltimore. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el virus pertenece a cualquiera de las familias que se seleccionan de la lista que comprende: *Hepadnaviridae*, *Caulimoviridae*, *Pseudoviridae*, *Metaviridae*, *Retroviridae*,  
40 *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Leviviridae*, *Narnaviridae*, *Picornaviridae*, *Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Calciviridae*, *Astroviridae*,  
45 *Nodaviridae*, *Tetraviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae*, *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Roniviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bromoviridae*, *Tymoviridae*, *Closteroviridae*, *Flexiviridae*, *Barnaviridae* y/o a cualquiera de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Varicosavirus*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus*, *Deltavirus*, *Iflavirus*, *Sadwavirus*, *Cheravirus*, *Sobemovirus*, *Umbravirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*,  
50 *Benyvirus*, *Ourmiavirus*, *Idaeovirus*.

*Hepadnaviridae* es una familia de virus que causan infecciones en hígado de humanos y de animales. Comprende dos géneros:

55 Género *Orthohepadnavirus*; especie tipo: Virus de la hepatitis B.

Género *Avihepadnavirus*; especie tipo: Virus de la hepatitis B del pato.

*Caulimoviridae* es una familia de virus ADN retrotranscritos (o pararetrovirus), que no presentan envoltura. Las partículas del virus contienen una nucleocápside de dos posibles formas: baciliforme o isométrica. Todos los virus de esta familia infectan plantas. La familia incluye los siguientes géneros:

Género *Badnavirus*; especie tipo: Virus del moteado amarillo de Commelina.

65 Género *Caulimovirus*; especie tipo: Virus del mosaico de la coliflor

Género *Tungrovirus*; especie tipo: Virus baciliforme del tungro del arroz.

## ES 2 349 970 A1

Género *Soymovirus*; especie tipo: Virus del moteado clorótico de la soja.

Género *Cavemovirus*; especie tipo: Virus del mosaico veteado de la yuca.

5 Género *Petuvirus*; especie tipo: Virus del veteado claro de la petunia.

*Pseudoviridae* es una familia de virus que infecta hongos e invertebrados. La familia incluye los siguientes generas:

10 Género *Pseudovirus*; especie tipo: Virus Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Género *Hemivirus*; especie tipo: Virus copia de *Drosophila melanogaster*.

15 *Metaviridae* es una familia de virus que se insertan como retrotransposones en el genoma de un huésped eucariote. La familia incluye los siguientes géneros:

Género *Metavirus*; especie tipo: Virus Ty3 de *Saccharomyces cerevisiae*.

20 Género *Errantivirus*; especie tipo: Virus gypsy de *Drosophila melanogaster*.

Género *Semotivirus*; especie tipo: Virus Tas de *Ascaris lumbricoides*.

25 *Retroviridae* es una familia de virus que comprende los retrovirus. Son virus con envoltura. Los retrovirus son responsables de muchas enfermedades, incluyendo algunos cánceres y el SIDA (VIH). La familia incluye los siguientes géneros:

30 Género *Alpharetrovirus*; especie tipo: Virus de la leucosis aviar.

Género *Betaretrovirus*; especie tipo: Virus del tumor mamario del ratón.

Género *Gammaretrovirus*; especie tipo: Virus de la leucemia murina; otra: Virus de la leucemia felina.

35 Género *Deltaretrovirus*; especie tipo: Virus de la leucemia bovina; otra: Virus linfotrópico T humano, causante de cáncer.

Género *Epsilonretrovirus*; especie tipo: Virus del sarcoma cutáneo del Walleye, que afecta a peces.

40 Género *Lentivirus*; especie tipo: Virus de la inmunodeficiencia humana 1; otras: Virus de la inmunodeficiencia del simia, Virus de la inmunodeficiencia felina.

Género *Spumavirus*; especie tipo: Virus espumoso del chimpancé.

45 *Cystoviridae* es una familia de virus infectivos para bacterias Gram negativas (bacteriófagos). El único género de la familia es *Cystovirus*.

50 *Reoviridae* es una familia de virus ARN de vertebrados que pueden afectar al sistema gastrointestinal (como los *Rotavirus*) y a las vías respiratorias del huésped. El nombre de "*Reoviridae*" se deriva de "virus respiratorio entérico huérfano", en donde el término "virus huérfano" hace referencia al desconocimiento de alguna enfermedad a la que poder asociar al virus. Aunque recientemente han sido identificadas diversas enfermedades causadas por los virus de la familia *Reoviridae*, el nombre original aún se utiliza.

55 Género *Orthoreovirus*; especie tipo: Orthoreovirus de los mamíferos.

Género *Orbivirus*; especie tipo: Virus de la lengua azul.

Género *Rotavirus*; especie tipo: Rotavirus A, una causa común de diarrea.

60 Género *Coitivirus*; especie tipo: Virus de la fiebre por garrapatas de Colorado (CTFV).

Género *Aquareovirus*; especie tipo: Aquareovirus A.

65 Género *Cypovirus*; especie tipo: Cypovirus 1 (CPV 1).

Género *Fijivirus*; especie tipo: Virus de la enfermedad de Fiji.

## ES 2 349 970 A1

Género Phytoreovirus; especie tipo: Virus del enanismo del arroz.

Género Oryzavirus; especie tipo: Virus del raquitismo andrajoso del arroz.

5 Género Idnoreovirus; especie tipo: Idnoreovirus 1.

Género Mycoreovirus; especie tipo: Mycoreovirus 1.

10 *Birnaviridae* es una familia de virus que afecta a animales. Incluye los siguientes géneros:

Género *Aquabirnavirus*; especie tipo: Virus de la necrosis pancreática infecciosa.

15 Género *Avibirnavirus*; especie tipo: Virus de la enfermedad bursal infecciosa.

Género *Entombirnavirus*; especie tipo: Virus X de la *Drosophila*.

20 *Totiviridae* es una familia de virus que afecta a animales. Incluye los siguientes géneros:

Género *Totivirus*; especie tipo: Virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae*.

Género *Giardiavirus*; especie tipo: Virus de *Giardia lamblia*.

25 Género *Leishmanivirus*; especie tipo: Virus ARN de *Leishmania* 1-1.

*Partitiviridae* es una familia de virus que infectan a plantas y hongos. La familia comprende actualmente tres géneros:

30 Género *Partitivirus*, por ejemplo, Virus de *Atkinsonella hypoxylon* (AhV) (infecta a un hongo).

Género *Alphacryptovirus*, por ejemplo, Virus críptico del trébol blanco 1 (WCCV-1).

35 Género *Betacryptovirus*, por ejemplo, Virus críptico del trébol blanco 2 (WCCV-2).

*Chrysoviridae* es una familia de virus que infectan a hongos, en particular a *Penicillium*.

40 *Hypoviridae* es una familia de virus que afecta a hongos. Se conoce un sólo género, *Hypovirus*.

*Bornaviridae* es una familia de virus que contiene una única especie, el virus de la enfermedad de Borna. La enfermedad de Borna es un síndrome infeccioso neurológico de los animales de sangre caliente, que causa comportamiento anormal y de mortalidad. Inicialmente fue identificado en el ganado ovino y en los caballos de Europa, y desde entonces se ha encontrado en una gran variedad de animales de sangre caliente incluyendo aves, ganado, perros y primates en Europa, Asia, África y América del Norte. Aunque el virus es considerado principalmente como el agente causal de la enfermedad en caballos y otros animales, recientes hallazgos parecen indicar que el virus de Borna puede desempeñar un papel en algunos desórdenes humanos neurológicos y psiquiátricos incluyendo el trastorno bipolar y la depresión.

50 *Rhabdoviridae* es una familia de virus infectivos para animales y plantas. Entre los animales infectados están insectos, peces y mamíferos, incluidos los humanos. *Rhabdoviridae* es una familia de virus infectivos para animales y plantas. Entre los animales infectados están insectos, peces y mamíferos, incluidos los humanos. La familia incluye los siguientes géneros:

55 Género *Cytorhabdovirus*; especie tipo: Virus de la necrosis amarilla de la lechuga.

Género *Ephemerovirus*; especie tipo: Virus de la fiebre efímera bovina.

60 Género *Lyssavirus*; especie tipo: Virus de la rabia.

Género *Novirhabdovirus*; especie tipo: Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa.

Género *Nucleorhabdovirus*; especie tipo: Virus del enanismo amarillo de la patata.

65 Género *Vesiculovirus*; especie tipo: Virus de la estomatitis vesicular.

## ES 2 349 970 A1

Adicionalmente se conoce un gran número de virus que todavía no han sido asignados a ningún género.

*Filoviridae* es una familia de virus del orden *Mononegavirales*. Causan serias fiebre hemorrágica virales, caracterizadas por anormalidades en el sangrado y en coagulación sanguínea, incluyendo el sangrado difuso. El virus Ébola destruye el sistema inmunológico. Incluye los géneros:

Género *Marburgvirus*.

Género *Ebolavirus*.

Los paramixovirus son miembros de la familia de virus *Paramyxoviridae*, infectivos para animales. *Paramixovirus* son retrovirus responsables de distintas enfermedades humanas, como el sarampión y las paperas; dos de los virus se sabe que provocan neumonía en los humanos: el virus sincicial respiratorio (VSR) y el de la *Parainfluenza*. El virus de la *Parainfluenza* también causa bronquitis y garrotillo (o croup), especialmente en los niños. Los *Paramixovirus* son también responsables de un determinado rango de enfermedades, como el moquillo canino, de entre otras especies animales. Sus géneros representativos son:

Subfamilia *Paramyxovirinae*:

Género *Avulavirus* (especie tipo Newcastle disease virus)

Género *Henipavirus* (especie tipo *Hendravirus*; incluye otros como *Nipahvirus*)

Género *Morbillivirus* (especie tipo *Measles virus*; incluye otros como Rinderpest virus, Canine distemper virus, phocine distemper virus)

Género *Respirovirus* (especie tipo Sendai virus; incluye otros como Human parainfluenza virus 1 y 3, así como el virus del resfriado común).

Género *Rubulavirus* (especie tipo Mumps virus; incluye otros como Simian parainfluenza virus 5, Menangle virus, Tioman virus)

Género TPMV-like viruses (especie tipo Tupaia paramyxovirus)

Subfamilia *Pneumovirinae*:

Género *Pneumovirus* (especie tipo virus respiratorio sincicial humano, incluye otros como el virus respiratorio sincicial bovino).

Género *Metapneumovirus* (especie tipo pneumovirus aviar, metapneumovirus humano).

Virus no asignados a géneros:

Fer-de-Lance virus.

Nariva virus.

Tupaia paramyxovirus.

Salem virus.

J virus.

Mossman virus.

Beilong virus.

Los *Orthomyxoviridae* son una familia de virus RNA que infectan a los vertebrados. Incluyen a los virus causante de la gripe. Incluye los géneros:

Influenzavirus A: aves y humanos, equinos, suinos, visón, focas, ballenas.

Influenzavirus B: humanos solamente.

## ES 2 349 970 A1

Influenzavirus C: humanos y suinos (rara enfermedad seria)

Orthomyxovirus transmitidos por garrapatas: infección humana ocasional.

5

El *Bunyaviridae* es una familia de virus ARN de vertebrados y plantas. Aunque por lo general se encuentran en artrópodos y roedores, ciertos virus de esta familia pueden infectar también a los humanos. La familia Incluye más de 300 miembros serológicamente distintos, divididos en 6 géneros, en tres grupos:

10 Grupo A: transmitidos por artrópodos a vertebrados

*Orthobunyavirus*: encefalitis Bunyamera, encefalitis de La Cross, fiebre Bwamba, fiebre por Guama, fiebre por Orepuche o Sambu.

15 *Phlebovirus*: fiebre del valle del Rift, fiebre de las moscas de la arena de Panamá y Brasil, fiebre de Nápoles y Sicilia.

Uukuniemi

20 *Nairovirus*: fiebre hemorrágica del Congo y Crimea, enfermedad de la cabra de Nairobi.

Grupo B transmitidos por artrópodos a plantas *Tospovirus*

Grupo C transmitidos por roedores a otros mamíferos

25

*Hantavirus*; Infecciones por *Hantavirus*: fiebre hemorrágica con síndrome renal y el síndrome pulmonar por *Hantavirus*.

30 Todos los virus de estos géneros infectan vertebrados, excepto los *Tospovirus* que sólo infectan artrópodos y plantas.

35 *Arenaviridae* es una familia de virus caracterizados por poseer un genoma constituido por dos segmentos de RNA de cadena simple. Los miembros del taxón se dividen en dos serotipos, que difieren tanto en su genética como en su distribución geográfica: el complejo del virus Lassa, del Viejo Mundo, y el complejo del virus *Tacaribe*, del Nuevo Mundo. La familia posee un único género, *Arenavirus*, cuya especie tipo es el virus de la coriomeningitis linfocitaria. Sus representantes afectan a vertebrados.

*Leviviridae* es una familia de virus infectivos para bacterias. Incluye:

40

Género *Levivirus*; especie tipo: Fago MS2 de Enterobacteria

Género *Allolevivirus*; especie tipo: Fago Q $\beta$  de Enterobacteria

45

*Narnaviridae* es una familia de virus que infectan hongos. Comprende los siguientes géneros:

Género *Narnavirus*; especie tipo: *Narnavirus* 20SRNA de *Saccharomyces cerevisiae*.

50

Género *Mitovirus*; especie tipo: Mitovirus-1 NB631 de *Cryphonectria parasitica*.

55 *Picornaviridae* es una familia de virus infectivos para animales. Los picornavirus incluyen importantes patógenos para humanos y animales. Las enfermedades que causa son variadas, como el resfriado común, poliomielitis e infecciones crónicas en el ganado. Dos categorías principales son los *Enterovirus* y *Rhinovirus*.

Los *Enterovirus* infectan al tracto entérico, mientras que los *Rhinoviruses* infectan principalmente nariz y garganta.

*Enterovirus* (EV).

60

*Enterovirus* bovino (BEV) BEV-1, BEV-2.

*Enterovirus* humano A 17 serotipos incluyendo virus coxsackie A y enterovirus.

65

*Enterovirus* humano B 56 serotipos incluyendo enterovirus, virus coxsackie B, echovirus y virus de la enfermedad vesicular porcina.

*Enterovirus* humano C 13 serotipos incluyendo enterovirus y virus coxsackie A1.

## ES 2 349 970 A1

*Enterovirus* humano D EV-68, EV-70, EV-9.

*Poliovirus* (PV), PV-1 (cepa Mahoney), PV-2 (cepa Lansing), PV-3 (P3/Leon/37).

5 *Enterovirus* porcino (PEV) A PEV-8.

*Enterovirus* porcino B PEV-9, PEV-10.

10 *Enterovirus* A del simio SEV-A1.

Entre los *Rhinovirus*:

15 *Rhinovirus* humano A, 74 serotipos.

*Rhinovirus* humano B 25 serotipos.

*Hepatovirus*:

20 Virus de la hepatitis A, Virus de la hepatitis A humano, virus de la hepatitis A del simio.

Virus de a encefalomiелitis aviar.

25

*Cardiovirus*:

Virus de la encefalomiocarditis, Virus Columbia SK, virus Maus Elberfeld, Mengovirus.

30

*Theilovirus*:

Virus de la encefalomiелitis murina de Theiler, virus de la encefalomiелitis humana de Vilyuisk, virus de la encefalomiелitis de la rata.

35

*Aphthovirus*:

Virus de la fiebre aftosa.

40

Virus de la rinitis equina A (ERAV).

*Parechovirus*:

45

Parechovirus humano (HPeV) HPeV-1, HPeV-2, HPeV-3.

Virus Ljungan Parechovirus del roedor.

50

*Erbovirus*:

Virus de la rinitis equina B (ERBV), ERBV-1, ERBV-2

55

*Kobuvirus*:

Virus Aichi.

60

Kobuvirus bovino

*Teschovirus*:

65

Teschovirus porcino.

## ES 2 349 970 A1

*Dicistroviridae* es una familia de virus que infectan insectos. Comprende las siguientes especies:

Virus de la parálisis letal del áfido.

5 Virus celular de la reina negra (infecta abejas).

Virus infeccioso de la flacidez de *Bombyx mori* (gusano de seda).

Virus de la parálisis del grillo.

10 Virus C de la *Drosophila*.

Virus P de *Himetobi*.

15 Virus intestinal de *Plautia stali* (un pentatómito).

Virus de *Rhopalosiphum padi* (un áfido).

Virus del *Triatoma* (vinchuca).

20 Virus de *Homalodisca coagulata* 1 (HoCV-1) (una cicadella).

Virus de *Soienopsis invicta* 1 (SINV-1) (una hormiga roja).

25 Estos virus todavía no han sido asignados a un género:

Virus de *Acheta domesticus* (un grillo).

Virus de la parálisis aguda de la abeja.

30 Virus Israel de la parálisis aguda (en parte responsable de la reciente desaparición de abejas).

Virus Cachemira de la abeja.

35 Virus del síndrome Taura (camarones).

*Marnaviridae* es una familia de virus de la cual se conoce un sólo género, *Marnavirus*. La especie tipo infecta al alga microscópica *Heterosigma akashiwo*.

40 *Sequiviridae* es una familia de virus que infectan plantas. La familia incluye los siguientes géneros:

Género *Sequivirus*; especie tipo: Virus del moteado amarillo del rábano.

45 Género *Waikavirus*; especie tipo: Virus esférico del tungro del arroz.

*Comoviridae* es una familia de virus que afectan a plantas. Comprende los siguientes géneros:

50 Género *Comovirus*; especie tipo: Virus del mosaico del caupí.

Género *Fabavirus*; especie tipo: Virus del marchitamiento del haba.

Género *Nepovirus*; especie tipo: Virus de las manchas anilladas del tabaco.

55 *Potyviridae* es una familia de virus que infectan plantas. Incluye los siguientes géneros:

Género *Potyvirus*; especie tipo: Virus Y de la patata.

60 Género *Rymovirus*; especie tipo: Virus del mosaico del raigrás.

Género *Bymovirus*; especie tipo: Virus del mosaico amarillo de la cebada.

Género *Macluravirus*; especie tipo: Virus del mosaico de la Madura.

65 Género *Ipomovirus*, especie tipo: Virus del moteado suave de la patata.

Género *Tritimovirus*; especie tipo: Virus del mosaico estriado del trigo.

## ES 2 349 970 A1

*Caliciviridae* (del latín calix, “cáliz”) es una familia de virus infectivos para animales y causantes de gastroenteritis en humanos. Los *Calicivirus* han sido encontrados en la mayoría de los animales domésticos y muchos silvestres, como cerdos, conejos, gallinas y anfibios. Sus géneros representativos son:

- 5           Género *Vesivirus*; especie tipo: Virus del Exantema Vesicular Porcino.  
            Género *Lagovirus*; especie tipo: Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo.  
            Género *Norovirus*; especie tipo: Virus de Norwalk (gastroenteritis en humanos).  
10           Género *Sapovirus*; especie tipo: Virus de Sapporo (gastroenteritis en humanos).

15           *Astroviridae* es una familia de virus que infectan mamíferos y aves. La familia *Astroviridae* contiene dos géneros: *Mamastrovirus* que infecta a los mamíferos y *Avastrovirus* que infecta a aves. Dentro de cada género se conocen varias especies, cada una de las cuales se denomina en función del huésped que infecta. Además, cada especie es subclasificada en serotipos. La única cadena de ARN tiene una cola de poli A en el extremo 3', pero no 5' cap.

### Género *Mamastrovirus*

- 20           *Astrovirus bovino*  
            *Astrovirus felino*  
25           *Astrovirus humano*  
            *Astrovirus ovino*  
            *Astrovirus porcino*  
30           *Astrovirus de visón*

### Género *Avastrovirus*

- 35           *Astrovirus del pollo*  
            *Astrovirus del pato*  
40           *Astrovirus del pavo*

45           *Nodaviridae* es una familia de virus que infectan animales. Su genoma es lineal y consta de 4.500 nucleótidos con un terminal cap 5' de metilato y un terminal 3' no de poliadenilato. La familia incluye los siguientes géneros:

- Género *Alphanodavirus*; especie tipo: Virus Nodamura.  
            Género *Betanodavirus*; especie tipo: Virus de la necrosis nerviosa del lucio rallado.

50           *Tetraviridae* es una familia de virus que infectan plantas. La familia incluye los siguientes géneros:

- Género *Betatetravirus*; especie tipo: Virus  $\beta$  de *Nudaurelia capensis*.  
55           Género *Omegatetravirus*; especie tipo: Virus  $\omega$  de *Nudaurelia capensis*.

60           *Luteoviridae* es una familia de virus que infectan plantas. La familia incluye los siguientes géneros:

- Género *Luteovirus*; especie tipo: Virus del enanismo amarillo de la cebada.  
            Género *Polerovirus*; especie tipo: Virus del enrollado de la hoja de patata.  
65           Género *Enamovirus*; especie tipo: Virus del mosaico enanizante del guisante 1.

## ES 2 349 970 A1

*Tombusvidae* es una pequeña familia de virus que infectan plantas. La familia incluye los siguientes géneros:

Género *Tombusvirus*; especie tipo: Virus del enanismo ramificado del tomate.

5 Género *Carmovirus*; especie tipo: Virus del moteado del clavel.

Género *Necrovirus*; especie tipo: Virus A de la necrosis del tabaco.

10 Género *Dianthovirus*; especie tipo: Virus de las manchas anilladas del clavel.

Género *Machlomovirus*; especie tipo: Virus del moteado clorótico del maíz.

Género *Avenavirus*; especie tipo: Virus del enanismo clorótico de la avena.

15 Género *Aureusvirus*; especie tipo: Virus latente del Pothos.

Género *Panicovirus*; especie tipo: Virus del mosaico del Panicum.

20 *Arteriviridae* es una familia de virus que infectan animales. La especie tipo es el virus de la arteritis equina (EAV), pero la familia incluye además el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), el virus de elevación de la lactato deshidrogenasa (LDV) del ratón y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV).

25 Los *Coronaviridae* son una familia de virus ARN desarrollados e infecciosos, con más de 12 patógenos específicos de mamíferos y aves. Ambos 5' y 3' terminales del genoma tienen una cubierta y un politracto (A) respectivamente, incluyendo a los siguientes géneros:

Género *Coronavirus*; sp. tipo: Virus bronquitis infecciosa

30 Género *Torovirus*; sp. tipo: torovirus equino

35 *Roniviridae* es una familia de virus de la que se conoce un solo género, *Okavirus*. La especie tipo es el *Virus asociado a las branquias*, que infecta peces.

*Flaviviridae* es una familia de virus que se propagan principalmente por vectores artrópodos (especialmente garrapatas y mosquitos). Incluye los siguientes géneros:

40 Género *Flavivirus* (la especie tipo es el Virus de la fiebre amarilla, también incluye el Virus del Nilo Occidental y el Virus del dengue). Se han identificado en total 67 virus en humanos y animales.

Género *Hepacivirus* (la especie tipo es el Virus de la hepatitis C, único miembro).

45 Género *Pestivirus* (la especie tipo es la Virus de la diarrea bovina, también Virus de la peste porcina). Otras especies infectan mamíferos no humanos.

50 Las terminaciones 5' de *Flavivirus* presentan un cap del nucleótido metilato, mientras que otros miembros de esta familia no lo tienen y codifican un punto de entrada ribosómico.

Las principales enfermedades causadas por la familia *Flaviviridae* incluyen: Dengue, Encefalitis japonesa, Enfermedad de Kyasanur, Encefalitis del Valle de Murray, Encefalitis de San Luis, Meningoencefalitis de garrapata, Encefalitis del Nilo, Fiebre amarilla y la Hepatitis C.

55 *Togaviridae* es una familia de virus que incluye los siguientes géneros:

Género *Alphavirus*; especies típicas: Sindbis virus, Virus de la encefalitis equina oriental, Virus de la encefalitis equina occidental, Virus de la encefalitis equina venezolana, Virus del Río Ross, Virus O'nyong'nyong.

60 Género *Rubivirus*; especies típicas: Rubeola virus.

65 La terminación o extremo 5' es un nucleótido metilado y el tercer término (extremo 3') tiene una cola poliadenilada de unos 70 nucleótidos, que recuerda a un ARN mensajero.

*Bromoviridae* es una familia de virus que infectan a plantas. Comprende las siguientes especies:

Género *Alfavirus*; especie tipo: Virus del mosaico de la alfalfa.

## ES 2 349 970 A1

Género *Ilarvirus*; especie tipo: Virus del estriado del tabaco.

Género *Bromovirus*; especie tipo: Virus del mosaico del Bromus.

5 Género *Cucumovirus*; especie tipo: Virus del mosaico del pepino.

Género *Oleavirus*; especie tipo: Virus latente de la oliva 2.

10 *Tymoviridae* es una familia de virus monopartícula que infectan plantas. El genoma consiste de un gran marco abierto de lectura con un cap en el término 5'. La familia incluye los siguientes géneros:

Género *Tymovirus*; especie tipo: Virus del mosaico amarillo del nabo

15 Género *Marafivirus*; especie tipo: Virus del rayado fino del maíz

Género *Maculavirus*; especie tipo: Virus del moteado de la vid

20 El género más extenso es *Tymovirus* con 24 especies, mientras que los otros dos géneros, *Marafivirus* y *Maculavirus* contienen 4 y 2 especies, respectivamente.

*Closteroviridae* es una familia de virus que afectan a plantas. Comprende los siguientes géneros:

25 Género *Closterovirus*; especie tipo: Virus de la amarillez de la remolacha.

Género *Crinivirus*; especie tipo: Virus de la amarillez infecciosa de la lechuga.

30 Género *Ampelovirus*; especie tipo: Virus del enrollado de las hojas de vid.

*Flexiviridae* es una familia de virus que infectan plantas. La familia incluye los siguientes géneros:

35 Género *Allexivirus*; especie tipo: Virus X de la chalota.

Género *Capillovirus*; especie tipo: Virus del tallo ranurado del manzano.

Género *Carlavirus*; especie tipo: Virus latente del clavel.

40 Género *Foveavirus*; especie tipo: Virus de las picaduras del tallo del manzano.

Género *Mandarivirus*; especie tipo: Virus de las manchas anilladas del mandarino.

45 Género *Potexvirus*; especie tipo: Virus X de la patata.

Género *Trichovirus*; especie tipo: Virus de las manchas cloróticas de la hoja del manzano.

Género *Vitivirus*; especie tipo: Virus A de la vid

50

Especies no asignadas a un género:

Virus del mosaico suave del banano.

55 Virus del moteado en anillo verde del cerezo.

Virus del moteado necrótico del cerezo.

60 Virus del manchado de la hoja del cítrico.

*Barnavidae* es una familia de virus de la que actualmente sólo se conoce un género, *Barnavirus*, cuya especie tipo es el Virus baciliforme de la seta.

65 El género *Varicosavirus* comprende virus de plantas asociados con la inflamación que causan en los tejidos vasculares. La infección ocurre a través del suelo por las esporas del hongo *Olpidium brassicae*.

## ES 2 349 970 A1

El género *Ophiovirus* se caracteriza por una nucleocápside alongada y muy filamentosa con simetría helicoidal. La especie mejor estudiada de este género es el virus de *Citrus psorosis*.

El género *Tenuivirus* comprende virus de plantas que son transmitidos por artrópodos (de las familias *Cicadellidae* o *Delphacidae*) y que causan enfermedad en su hospedador, caracterizada por rayas cloróticas en las hojas afectadas.

En el género *Deltavirus* se encuentra el virus causante de la hepatitis D (Hepatitis delta virus o hepatitis D virus, HDV). El virus de la Hepatitis D: es un virus con genoma ARN de polaridad negativa, con cápside icosaédrica, y envoltura que corresponde a la envoltura del Virus de la Hepatitis B (por lo tanto requiere de la coinfección con este virus para su desarrollo).

Los géneros *Iflavirus*, *Sadwavirus*, *Umbravirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus*, *Ourmiavirus*, *Idaeovirus* comprenden virus que infectan plantas y aún no se les ha asignado familia.

Todos los virus de RNA que inician la síntesis proteica mediada por una entrada interna del ribosoma (IRES) y que se han testado son portadores de estructuras sensibles a la RNasa P, bien sea esta de origen humano, y/o bacteriano. Entre estos virus se encuentra el virus de la hepatitis C, y otros virus de la Familia *Flaviviridae* y *Picornaviridae*. Así pues, en otra realización más preferida de la invención, el virus de RNA pertenece a la familia *Flaviviridae*. Dentro de la familia *Flaviviridae* se encuentran el virus de la Hepatitis C, el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), y el virus de la diarrea viral bovina. Por tanto, en una realización aún más preferida de la invención, el virus de RNA se selecciona de la lista que comprende el virus de la Hepatitis C, el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), y el virus de la diarrea viral bovina.

Dentro de la familia *Picornaviridae* se encuentra el virus de la Hepatitis A, el *Poliovirus*, el *Rhinovirus*, el virus de la encefalomiocarditis y el virus de la fiebre aftosa (*Aphthovirus*). Por tanto, en una realización aún más preferida de la invención, el virus de RNA se selecciona de la lista que comprende el virus de la Hepatitis A, el *Poliovirus*, el *Rhinovirus*, el virus de la encefalomiocarditis y el virus de la fiebre aftosa (*Aphthovirus*).

En otra realización más preferida de la invención, el virus de RNA se selecciona de la lista que comprende: virus de la Leucemia Murina de Friend, virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV), virus del sarcoma de Rous, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus intestinal de *Plautia stali*, Rhopalosiphum padi virus, virus de la parálisis Cricket, Triatoma virus y el virus del sarcoma de Kaposi. En todos estos virus se han detectado secuencias IRES.

En esta memoria se entiende por “entrada interna del ribosoma” ó “*internal ribosome entry site*” ó “IRES” a una secuencia nucleotídica que permite la iniciación de la síntesis proteica en el medio de la traducción del marco abierto de lectura de un RNA mensajero (mRNA o ARNm). A diferencia del mecanismo más conocido de traducción proteica en organismos eucariontes que requiere una modificación previa en el extremo 5' del mRNA mensajero para el ensamblaje de la maquinaria de traducción, las secuencias IRES son reconocidas por el complejo de pre-iniciación 43S, de manera que pueden comenzar la traducción del RNA mensajero pesar de carecer de modificación Cap en su extremo 5'. Recientemente se han encontrado secuencias IRES en mRNA de organismos eucariontes que se expresan en condiciones de estrés, en el ciclo celular y en mecanismos apoptóticos.

Otro aspecto se relaciona con el uso de una construcción genética que permite la transcripción de una secuencia nucleotídica de DNA a la secuencia nucleotídica de RNA de la invención, tal y como se ha descrito anteriormente. Así, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una construcción genética, de aquí en adelante construcción genética de la invención, que dirige la transcripción *in vitro* o *intracelular* de la secuencia nucleotídica de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:

a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferiblemente de doble cadena, que comprende cualquiera de las secuencias que se transcribe *in vitro* o intracelularmente a la secuencia de nucleótidos de la invención,

b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia según a) operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc ... para inhibir la replicación de virus de RNA.

Múltiples de estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y forman parte de la presente invención.

Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

## ES 2 349 970 A1

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

“Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia que se transcribe a la secuencia nucleotídica de la invención, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Tal como se usa “secuencia codificadora” en esta memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se transcribe al RNA de la invención cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los virus de RNA pertenecen a las familias que se seleccionan de la lista que comprende: *Hepadnaviridae*, *Caulimoviridae*, *Pseudoviridae*, *Metaviridae*, *Retroviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Bimaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Leviviridae*, *Narnaviridae*, *Picornaviridae*, *Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae*, *Nodaviridae*, *Tetraviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae*, *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Roniviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bromoviridae*, *Tymoviridae*, *Closteroviridae*, *Flexiviridae*, *Barnaviridae* y/o a cualquiera de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Varicosavirus*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus*, *Deltavirus*, *Iflavirus*, *Sadwavirus*, *Cheravirus*, *Sobemovirus*, *Umbravirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus*, *Ourmiavirus*, *idaevirus*. En otra realización más preferida, el virus de RNA pertenece a la familia *Picornaviridae*. En otra realización más preferida, el virus de RNA pertenece a la familia *Flaviviridae*. En una realización aún más preferida el virus de RNA se selecciona de la lista que comprende: *Poliovirus*, *Rhinovirus*, virus de la encefalomiocarditis, virus de la fiebre aftosa (*Aphthovirus*), virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis C, virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), virus de la diarrea viral bovina, virus de la Leucemia Murina de Friend, virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV), virus del sarcoma de Rous, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus intestinal de *Plautia stali*, *Rhopalosiphum padi* virus, virus de la parálisis Cricket, *Triatoma* virus y el virus del sarcoma de Kaposi. En una realización particular de este aspecto de la invención, el virus de RNA es el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC).

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, o la construcción genética de la invención.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a una planta ó animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, ... de la planta ó animal. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de secuencia nucleotídica o construcción genética de la invención que produzcan el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica, la construcción genética o la composición farmacéutica de la invención como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica, la construcción genética o la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en plantas, animales y/o en el hombre. En el contexto de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica o la construcción genética de la invención, o a una composición que comprende la secuencia nucleotídica o la construcción genética de la invención con vehículos, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de las enfermedades provocadas por los virus de RNA.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica, la construcción genética o la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades provocadas por los virus de RNA. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los virus de RNA pertenecen a las familias que se seleccionan de la lista que comprende: *Hepadnaviridae*, *Caulimoviridae*, *Pseudoviridae*, *Metaviridae*, *Retroviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Leviviridae*, *Narnaviridae*, *Picornaviridae*, *Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae*, *Nodaviridae*, *Tetraviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae*, *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Roniviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bromoviridae*, *Tymoviridae*, *Closteroviridae*, *Flexiviridae*, *Barnaviridae* y/o a cualquiera de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Varicosavirus*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus*, *Deltavirus*, *Iflavirus*, *Sadwavirus*, *Cheravirus*, *Sobemovirus*, *Umbravirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus*, *Ourmiavirus*, *Idaeovirus*. En una realización más preferida, los virus de RNA pertenecen a la familia *Picornaviridae*. En otra realización más preferida, los virus de RNA pertenecen a la familia *Flaviviridae*.

Más preferiblemente, los virus de RNA se seleccionan de la lista que comprende: *Poliovirus*, *Rhinovirus*, virus de la encefalomiocarditis, virus de la fiebre aftosa (*Aphthovirus*), virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis C, virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), virus de la diarrea viral bovina, virus de la Leucemia Murina de Friend, virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV), virus del sarcoma de Rous, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus intestinal de *Plautia stali*, *Rhopalosiphum padi* virus, virus de la parálisis Cricket, *Triatoma* virus y el virus del sarcoma de Kaposi. En una realización particular de la invención, el virus de RNA es el virus de la Peste Porcina Clásica.

Los términos “nucleótido”, “polinucleótido” y “ácidos nucleicos” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (RNA ó ARN) como desoxirribonucleótidos (DNA ó ADN).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### 40 Descripción de las figuras

Fig. 1. Corte *in vitro* de la ribozima de *Synechocystis* sp. sobre el fragmento de RNA 1-770 nt del genoma del virus de la peste porcina clásica (PPC).

El ensayo se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ l durante 1 hora y a una temperatura de 37°C. La ribozima, a una concentración de 135 nM se preincubó en tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub> y 1M KCl), 4% PEG y 20U RNAsin durante 15 minutos a 37°C antes de añadir el sustrato de corte: PPC RNA 1-770nt a una concentración de 1.8 nM. La reacción se paró incorporando dos volúmenes de tampón de carga al tubo de reacción y los productos de corte resultantes se resolvieron en gel de acrilamida al 4%, 7 M urea, siendo visualizados por autoradiografía. En el carril izquierdo puede observarse un control de reacción en el cual el RNA de PPC fue incubado en buffer sin ribozima. A continuación la reacción con la ribozima en la que se observan bandas diferenciales de corte con respecto al control indicadas mediante flechas. Los marcadores de peso molecular se encuentran en el carril derecho. Algunas de las bandas de corte, marcadas por flechas como 1 y 2, fueron aisladas de gel y mediante técnica de 5' RACE y posterior clonaje y secuenciación se determinaron sus extremos en 5'. Tanto la banda 1 como la banda 2 dieron como resultado que el corte se producía entre las bases 354-355.

Fig. 2. Efecto antiviral del ribozima.

Se muestran los resultados de 2 experimentos representativos. En el experimento A la ribozima supuso una reducción del RNA viral de unas 10 veces. En el experimento B, de unas 2 veces. En ambos casos las diferencias son estadísticamente significativas.

Fig. 3. La transfección del ribozima (carriles 3) no induce la inhibición general de la síntesis de proteínas, mientras que la transfección del RNA de doble cadena poly I:C (carriles 4), si.

Las bandas han sido cuantificadas mediante un programa de análisis de imágenes. Solo las muestras 4 son significativamente diferentes de las demás. 1.- Células no transfectadas, 2.- Células transfectadas sin ribozima, 3.- Células transfectadas con ribozima, 4.- Células transfectadas con poly I:C.

Fig. 4. la transfección del ribozima (foto 4) no induce citotoxicidad, mientras que la transfección del RNA de doble cadena poly I:C (foto 3), si.

Fig. 5. Clonaje y secuenciación del producto de corte.

5

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la RNAasa P como antiviral.

10

### 1.- Síntesis del ribozima RNasa P de *Synechocystis* sp. por transcripción *in vitro*

La molécula de ribozima se sintetizó mediante transcripción *in vitro* utilizando el kit Megascript (Ambion) a partir del plásmido pT76803 digerido con el enzima de restricción Dral. Este plásmido contiene el gen de la subunidad de RNA de la RNasa P perteneciente a la cianobacteria *Synechocystis* sp. de 437 nt de longitud, bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa. El RNA catalítico se purificó mediante columna comercial Megaclear (Ambion). Posteriormente la actividad del ribozima se calibró en un rango de concentraciones de 0.5 a 250 nM utilizando para ello el RNA sustrato natural correspondiente al precursor preRNA-GIn de *Synechocystis* sp. marcado internamente con el isótopo radiactivo [ $\alpha$ -P32]GTP. La concentración empleada en los ensayos de corte se eligió en base a estos resultados de calibración.

15

20

### 2.- Ensayo de corte del RNA *in vitro*

La ribozima se preincubó en tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub> y 1M KCl), 4% PEG y 20U RNAsin (Promega) durante 15 minutos a 37°C antes de añadir el sustrato de corte a una concentración final de 1'8 nM. Estas condiciones iónicas fueron optimizadas en trabajos previos de Pascual y Vioque A. Ejemplifican el plegamiento correcto del ribozima para que pueda ejercer su actividad catalítica. El ensayo se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu$ l durante 1 hora y a una temperatura de 37°C. La reacción se paró incorporando dos volúmenes de tampón de carga (0.3% azul de bromofenol, 0.3% xilencianol, 10 mM EDTA pH 7.5 y 97.5% de formamida desionizada) al tubo de reacción y los productos de corte resultantes se resolvieron en gel de acrilamida al 4%, 7 M urea, siendo visualizados por autoradiografía (Figura 1).

30

35

### 3.- Ensayo de actividad antiviral en cultivo celular

Se sembraron células PK-15 (línea celular derivada de riñón porcino) en placas de cultivos de 24 pocillos (m24), aproximadamente 105 células por pocillo, en medio DMEM suplementado con 10% suero de ternera fetal (STF). Al día siguiente se cambió el medio por medio Optimem (Gibco) y se prepararon las mezclas de transfección utilizando el reactivo Lipofectina (Invitrogen) y las condiciones recomendadas por el fabricante. La mezcla de transfección, para 4 pocillos, contenía 2  $\mu$ g de ribozima y 20  $\mu$ l de lipofectina, en un volumen final de 250  $\mu$ l de Optimem por pocillo. Como control se preparó una mezcla de transfección sin ribozima, en idénticas condiciones.

45

La mezcla de transfección se añadió a las monocapas celulares y se incubaron 3 h a 37°C. A continuación se cambió el medio por 250  $\mu$ l de medio DMEM suplementado con 1% STF, conteniendo virus de la peste porcina clásica (cepa Alfort) a una multiplicidad de infección de aprox. 0.5 TCID (tissue culture infectious dose) por célula. Transcurrida 1 h de adsorción se retiró el inoculo y se sustituyó por medio DMEM suplementado con 1% STF.

50

A las 24 h post-infección se aspiró el medio y se recogió el RNA celular total utilizando el reactivo TriReagent (Sigma), 250  $\mu$ l por pocillo, y las condiciones recomendadas por el fabricante. A continuación se cuantificó el RNA viral mediante Real Time RT-PCR en un termociclador Light Cycler (Roche), utilizando el kit LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche) y los oligonucleótidos PPC-A (SEQ ID NO: 2) y PPC-D (SEQ ID NO: 3) como *primers*.

55

### 4.- Incorporación de <sup>35</sup>S-Metionina

Las células se transfectaron con ribozima como se describe en el apartado anterior. Como controles se utilizaron células no transfectadas, células transfectadas sin RNA y células transfectadas con poly (I:C). A las 8 h post-transfección el medio de cultivo se sustituyó por medio sin metionina y 2 h después se cambió por 250  $\mu$ l de medio sin metionina conteniendo 50  $\mu$ Ci de <sup>35</sup>S-Metionina. Al cabo de 2 h de incubación se recogieron los extractos celulares en buffer de lisis, se resolvieron en un gel de 10% poliacrilamida y se visualizó la radiactividad incorporada mediante autoradiografía. Para cuantificar la radiactividad incorporada se utilizó el programa de análisis de imágenes ImageGauge (Fujifilm) sobre la imagen digitalizada.

65

### 5.- Clonaje y secuenciación del producto de corte del ribozima

Para amplificar el producto de corte dejado por el ribozima se utilizó el kit 573' RACE Kit, 2nd generation, de Roche, y las condiciones recomendadas por el fabricante. Brevemente, el RNA procedente de células transfectadas e infectadas como se describe anteriormente se utilizó como molde para sintetizar una copia de cDNA mediante transcripción reversa (*primer*. Alf751-R, SEQ ID NO: 4). A continuación se utilizó transferasa terminal para añadir una cola de poly(A) en el extremo 3' del cDNA, seguido por dos rondas de PCR (nested PCR) utilizando en cada una un *primer* específico de la secuencia viral (Alf 626-R SEQ ID NO: 5 y Alf601-R SEQ ID NO: 6) y otro complementario a la cola de poly(A), suministrado en el kit. Finalmente el producto de la PCR se visualizó en un gel de 2% agarosa y se clonó utilizando el sistema pGEM-T-Easy (Promega).

### Resultados

#### 1.- Actividad catalítica del ribozima *in vitro* sobre el RNA de los virus de hepatitis C, diarrea viral bovina y peste porcina clásica

RNAs conteniendo la secuencia correspondiente al extremo 5' del genoma de los virus indicados, y marcados con <sup>32</sup>P se incubaron en presencia y en ausencia del ribozima de *Synechocystis* sp., en las condiciones que se describen en materiales y métodos. A continuación los RNAs se resolvieron en un gel de poliacrilamida 4% desnaturizante y se visualizaron por autoradiografía. Como se puede ver en la figura 1, en presencia de ribozima se observa específicamente la aparición de una banda de menor tamaño, correspondiente al producto de corte del ribozima.

#### 2.- Ensayo de la actividad antiviral del ribozima en cultivos celulares infectados por el virus de la peste porcina clásica

Cultivos de células PK-15 (línea celular procedente de riñón de cerdo y susceptible a la replicación del virus de la peste porcina clásica) se transfectaron con ribozima, según se describe en materiales y métodos. Como control, células fueron transfectadas en paralelo con una mezcla de transfección que no contenía RNA. En algunos experimentos (no mostrado) se utilizaron como control negativo células transfectadas con un RNA irrelevante, obteniéndose los mismos resultados. A las 3 h el medio de transfección se sustituyó por medio conteniendo virus de la peste porcina clásica (cepa Alfort).

A las 24 h post-transfección se obtuvo el RNA total de las células infectadas y se cuantificó el RNA viral mediante RT-PCR en tiempo real. La figura 2 muestra el resultado de 2 experimentos representativos. Como se puede ver en la figura, en presencia del ribozima la cantidad de RNA viral a las 24 h post-infección se reduce entre 2 y 10 veces respecto a los controles sin ribozima.

#### 3.- La transfección del ribozima no induce un bloqueo generalizado de la síntesis de proteínas en la célula

Para descartar la posibilidad de que el efecto antiviral detectado fuese debido a la activación de mecanismos de defensa no específicos que resultasen en una parada generalizada de la síntesis de proteínas, analizamos la incorporación de <sup>35</sup>S-Metionina en células transfectadas con ribozima. Como controles negativos se utilizaron células no transfectadas y células transfectadas sin ribozima. Como control positivo se transfectó poly (I:C), un RNA de doble cadena sintético que induce la respuesta de Interferón de tipo I. Como se puede ver en la figura 3, la incorporación de <sup>35</sup>S-Metionina en células transfectadas con ribozima no presentó diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) respecto a las células no transfectadas o transfectadas sin ribozima, mientras que las células transfectadas con poly (I:C) si experimentaron una reducción significativa en la síntesis de proteínas.

#### 4.- La transfección del ribozima no aumenta de modo apreciable la mortalidad celular

Para descartar que la disminución en los niveles de replicación viral en células con ribozima pudiese ser debida a un aumento de la mortalidad celular, debida a toxicidad de la lipofectina o a la inducción de apoptosis en las células transfectadas, se observaron las células mediante microscopía, a las 24 h post-transfección. Como se puede apreciar en la figura 4, las monocapas celulares transfectadas con ó sin ribozima presentaban un aspecto similar al de las células control, mientras que las células transfectadas con poly (I:C) mostraban un grado alto de mortalidad, debida a la apoptosis inducida por la respuesta interferón de tipo I.

#### 5.- Detección del producto de corte *in vivo*

Para intentar detectar el producto de corte del ribozima en las células transfectadas e infectadas, se utilizó la técnica de 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Esta técnica permite identificar el extremo 5' de una molécula de RNA. Como se puede ver en la figura 5, en células transfectadas sin ribozima, el producto mayoritario amplificado corresponde al tamaño esperado al amplificar la secuencia correspondiente al RNA viral genómico intacto.

## ES 2 349 970 A1

Sin embargo, cuando se aplicó la técnica de RACE sobre RNA proveniente de células transfectadas con Ribozima, el producto mayoritario amplificado correspondía a un tamaño menor. El producto de PCR fue clonado y secuenciado para determinar el punto exacto de corte por el ribozima. La secuencia revela que el primer nucleótido correspondiente a la secuencia viral es el nucleótido 366, lo que sugiere que el corte por el ribozima tiene lugar entre los nucleótidos 365 y 366. Este punto de corte (8 nucleótidos antes del codón de iniciación de la poliproteína) es compatible con el resultado de corte obtenidos en los experimentos de corte *in vitro* (figura 1), tan sólo a 11 nt corriente arriba. La no-exactitud puede ser debida tanto a una pequeña degradación del RNA viral en el interior celular, o a una pequeña diferencia en la zona de corte de la ribozima *in vivo* e *in vitro*. Tan solo señalar que el punto de corte de la actividad RNasa P humana ensayada *in vitro* sobre este PPC se localiza justo entre los puntos corte de la ribozima *in vitro* e *in vivo*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la secuencia nucleotídica con actividad catalítica de la ribozima RNasa P de *Synechocystis* sp. que se selecciona de entre:
- a. las moléculas de ácido nucléico que comprenden la SEQ ID NO: 1, 6
  - b. moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de (a),  
10 para inhibir la replicación de virus de RNA.
- 15 2. Uso de un fragmento de la secuencia nucleotídica según la reivindicación anterior, donde el fragmento posee la actividad catalítica de la ribozima RNasa P de *Synechocystis* sp.
- 20 3. Uso de la secuencia nucleotídica con actividad catalítica de la ribozima 5 RNasa P de *Synechocystis* sp. según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la secuencia nucleotídica presenta una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO: 1.
- 25 4. Uso de la secuencia nucleotídica con actividad catalítica de la ribozima RNasa P de *Synechocystis* sp. según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la secuencia nucleotídica presenta una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 1.
- 30 5. Uso de la secuencia nucleotídica con actividad catalítica de la ribozima RNasa P de *Synechocystis* sp. según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la secuencia nucleotídica presenta una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO: 1.
- 35 6. Uso de la secuencia nucleotídica con actividad catalítica de la ribozima RNasa P de *Synechocystis* sp. según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la secuencia nucleotídica presenta una identidad de al menos un 95% con la SEQ ID NO: 1.
- 40 7. Uso de una construcción genética que dirige la transcripción *in vitro* o *intracelular* de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende:
- a. secuencia de nucleótidos de DNA que comprende cualquiera de las secuencias que se transcriben *in vitro* o intracelularmente a la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6,6
  - b. secuencia de nucleótidos de DNA correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia según (a) operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.
- 45 8. Uso de una construcción genética según la reivindicación 7, donde la secuencia de nucleótidos de DNA es de doble cadena.
- 50 9. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde los virus de RNA pertenecen a las familias que se seleccionan de la lista que comprende: *Hepadnaviridae*, *Caulimoviridae*, *Pseudoviridae*, *Metaviridae*, *Retroviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Leviviridae*, *Narnaviridae*, *Picornaviridae*, *Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae*, *Nodaviridae*, *Tetraviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae*, *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Roniviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bromoviridae*, *Tymoviridae*, *Closteroviridae*, *Flexiviridae*, *Barnaviridae* y/o a cualquiera de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Varicosavirus*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus*, *Deltavirus*, *Iflavirus*, *Sadwavirus*, *Cheravirus*, *Sobemovirus*, *Umbravirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus*, *Ourmiavirus*, *Idaeovirus*.
- 60 10. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el virus de RNA pertenece a la familia *Picornaviridae*.
- 65 11. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el virus de RNA pertenece a la familia *Flaviviridae*.
12. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el virus de RNA se selecciona de la lista que comprende: *Poliovirus*, *Rhinovirus*, virus de la encefalomiocarditis, virus de la fiebre aftosa (*Aphthovirus*), virus de la Hepatitis A, virus de

## ES 2 349 970 A1

la Hepatitis C, virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), virus de la diarrea viral bovina, virus de la Leucemia Murina de Friend, virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV), virus del sarcoma de Rous, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus intestinal de *Plautia stali*, *Rhopalosiphum padi* virus, virus de la parálisis Cricket, *Triatoma* virus y el virus del sarcoma de Kaposi.

5

13. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el virus de RNA es el virus de la Peste Porcina Clásica.

10

14. Composición farmacéutica que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8.

15

15. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, como medicamento.

20

16. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, para la elaboración de un medicamento.

25

17. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades provocadas por los virus de RNA.

30

18. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, según la reivindicación 17, donde los virus de RNA pertenecen a las familias que se seleccionan de la lista que comprende: *Hepadnaviridae*, *Caulimoviridae*, *Pseudoviridae*, *Metaviridae*, *Retroviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Leviviridae*, *Namaviridae*, *Picornaviridae*, *Dicistroviridae*, *Marnaviridae*, *Sequiviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae*, *Nodaviridae*, *Tetraviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae*, *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Roniviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bromoviridae*, *Tymoviridae*, *Closteroviridae*, *Flexiviridae*, *Barnaviridae* y/o a cualquiera de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Varicosavirus*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus*, *Deltavirus*, *Iflavirus*, *Sadwavirus*, *Cheravirus*, *Sobemovirus*, *Umbravirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus*, *Ourmiavirus*, *Idaeovirus*.

40

19. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, según la reivindicación 17, donde los virus de RNA pertenecen a la familia *Picornaviridae*.

45

20. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, según la reivindicación 17, donde los virus de RNA pertenecen a la familia *Flaviviridae*.

50

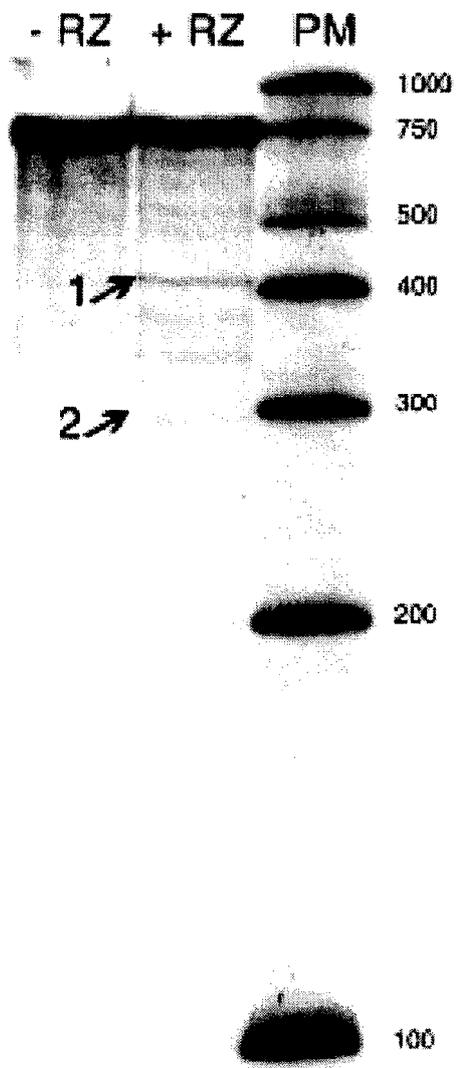
21. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, según la reivindicación 17, donde los virus de RNA se seleccionan de la lista que comprende: *Poliovirus*, *Rhinovirus*, virus de la encefalomiocarditis, virus de la fiebre aftosa (*Aphthovirus*), virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis C, virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), virus de la diarrea viral bovina, Friend murine leukemia, Moloney murine leukemia (MMLV), virus del sarcoma de Rous, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Plautia stali* intestine virus, *Rhopalosiphum padi* virus, Cricket paralysis virus, *Triatoma* virus y el virus del sarcoma de Kaposi.

55

22. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 14, según la reivindicación 17, donde el virus de RNA es el virus de la Peste Porcina Clásica.

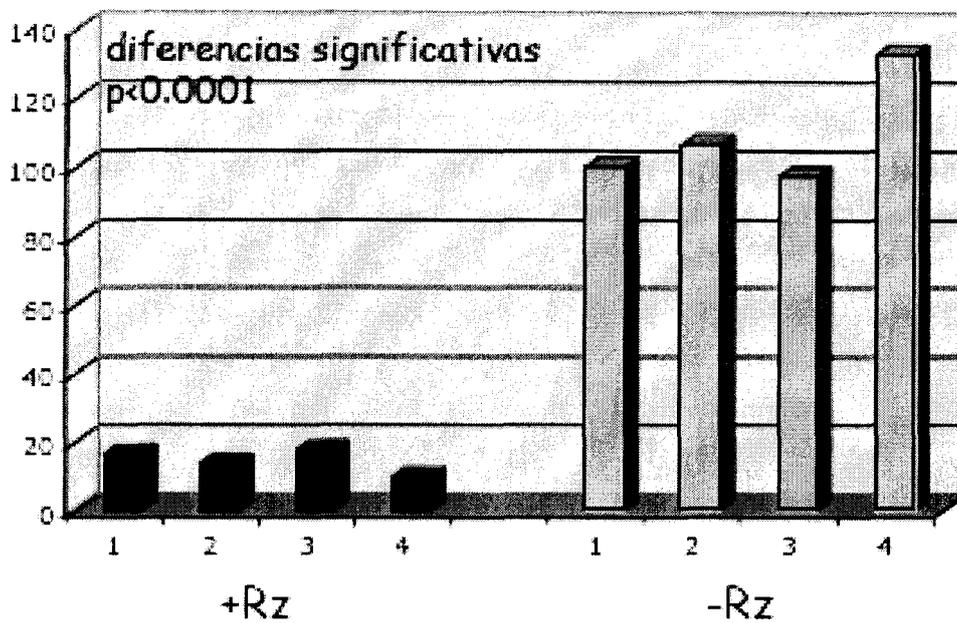
60

65



**FIG 1**

### A



### B

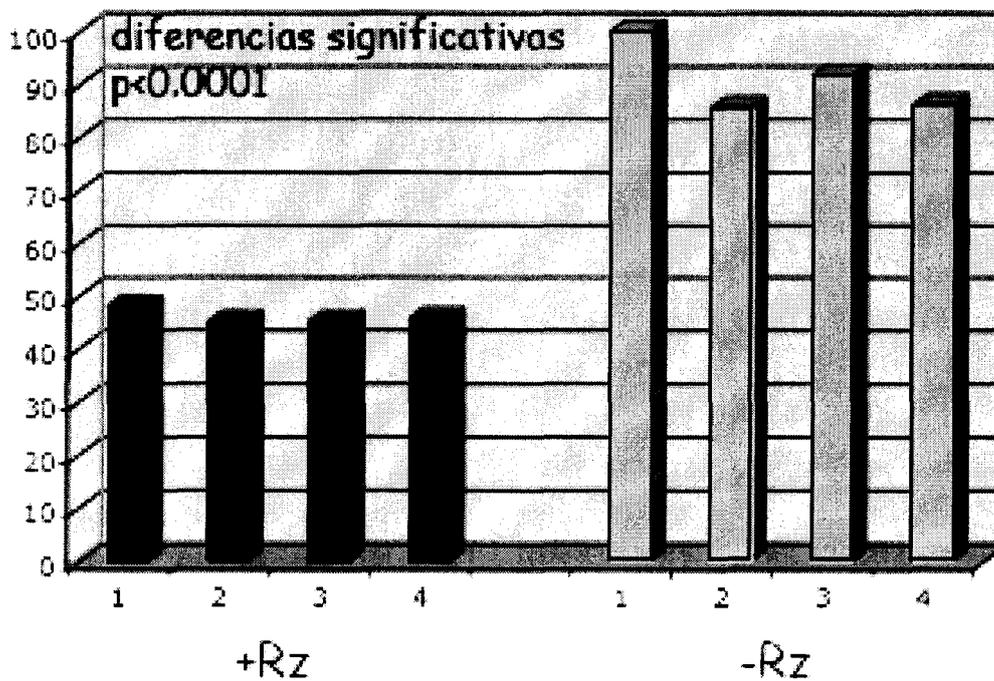
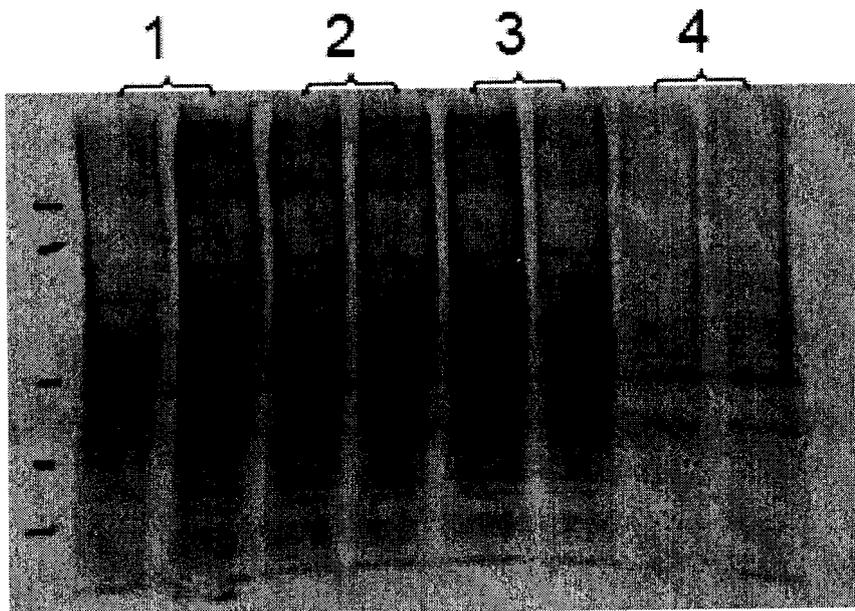
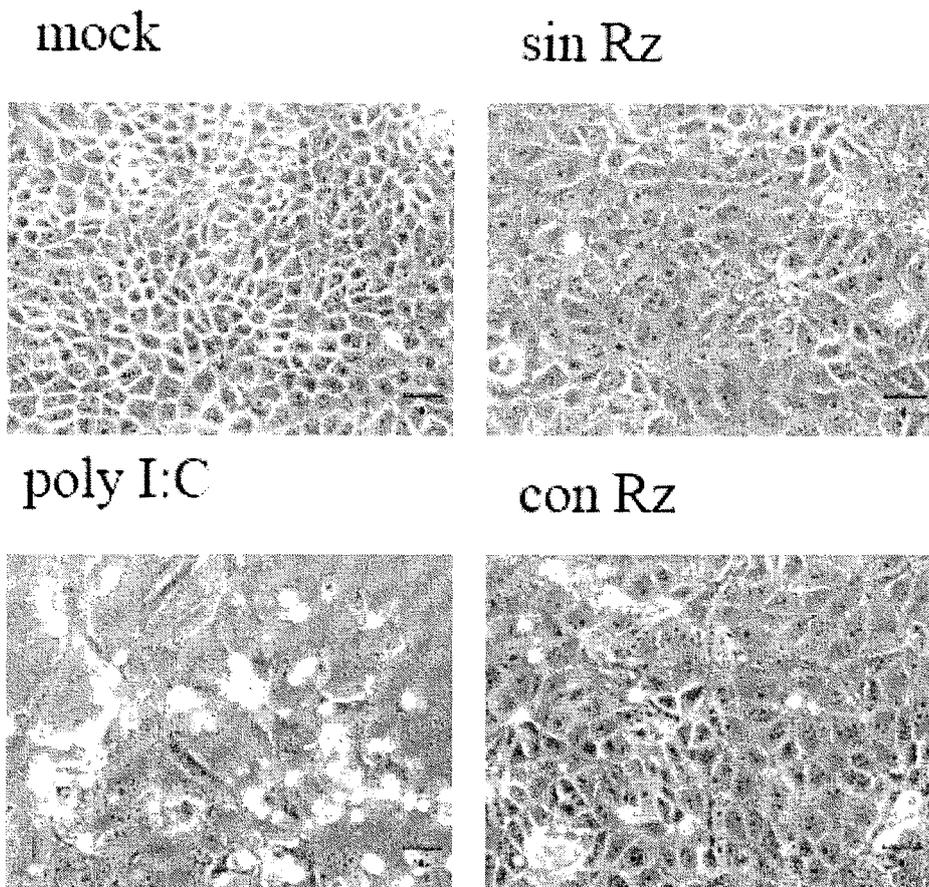


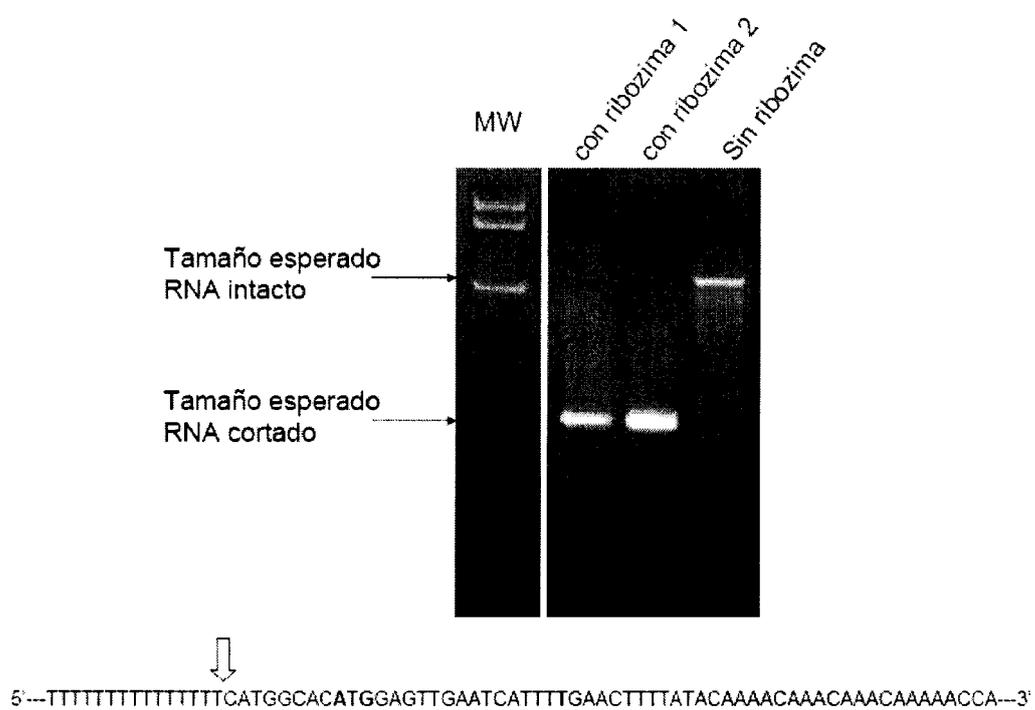
FIG 2A y 2B



**FIG 3**



**FIG 4**



**FIG 5**

# ES 2 349 970 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

5 Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área Temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)  
Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)  
Universidad de Castilla La Mancha (UCLM)

10 <120> Uso de la RNasa P como agente antiviral.

<130> ES1641.252

15 <160> 6

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

20 <211> 437

<212> RNA

<213> Synechocystis PCC6803

25

<400> 1

30 gagaguagg gagggaguug cggauuccug ucacagggaa ucugaggaaa guccgggcuu  
60

cccaaaggcc aaacuugcug gguaacgccc agugcgcgcg agcgugagga cagugccaca  
120

35 gaaaaauacc gcccuuuua gaaaacagca accaguaaac aguuaacagg guuuuucugc  
180

ugacuaacug guaacugacc acugaaaagg uaagggugca aaggugcggu aagagcgcac  
240

40 cagcaguauc gagagguacu ggcucgguaa accccgguug gaagcaaggu cggaggggca  
300

aagguugguc uuuuuccugc cccaugauug guggaaccgc uugaggaauu ugguaacaaa  
360

45

uuucccagau agauaacucc ccaagggugc cucgcauccu ggaacagaac ccggcuuacg  
420

50

acuaacucuc uuuuuuu  
437

<210> 2

55 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

60

<220>

<223> cebador

<400> 2

65

atatatgctc aagggcgagt  
20

# ES 2 349 970 A1

<210> 3  
<211> 24  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador  
10

<400> 3  
15 **acagcagtag tatccatttc ttta**  
**24**

<210> 4  
<211> 19  
20 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> cebador

<400> 4  
30 **tccgtcacta cctgtcacc**  
**19**

<210> 5  
35 <211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> cebador

45 <400> 5  
**gctttacata tatcccgcta acc**  
**23**

50

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
55 <213> Artificial

<220>  
60 <223> cebador

<400> 6  
65 **gcctagatgg ttgccactcc**  
**20**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud:200803224

22 Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2008

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12N15/11** (2006.01)  
**A61P31/14** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SABARIEGOS, R. et al., 'Catalytic RNase P RNA from <i>Synechocystis</i> sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon.', FEBS LETTERS, 2004, Vol. 577, No. 3, páginas 517-522, ISSN: 0014-5793, Resultados, apartados 3.2., 3.3. y 3.4.; Discusion.	1-9,11,12, 14-18,20,21
Y	Todo el documento.	12,13,21,22
X	SERRANO, P. et al., 'Characterization of a cyanobacterial RNase P ribozyme recognition motif in the IRES of foot-and-mouth disease virus reveals a unique structural element', RNA, 2007, Vol. 13, No. 6, páginas 849-859, ISSN: 1355-8382, Resultados; Discusion.	1-10,12,14-19,21
X	VIOQUE, A., 'Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1992, Vol. 20, No. 23, páginas 6331-6337, ISSN: 0305-1048, Resultados, Figura 3.	1-8
X	PASCUAL, A. et al., 'Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and <i>Escherichia coli</i> are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors.', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, 1999, Vol. 96, No.12, páginas 6672-6677, ISSN: 0027-8424, Resultados; Discusion.	1-8
Y	FLETCHER, S. P. et al., 'Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: Elements in the 5' untranslated region important for IRES function', JOURNAL OF VIROLOGY, 2002, Vol. 76, No. 10, páginas 5024-5033, ISSN: 0022-538X, Resultados y Discusion.	12,13,21,22
Y	MOES, L. et al., 'The internal initiation of translation in bovine viral diarrhea virus RNA depends on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon', VIROLOGY JOURNAL, 2007, Vol. 4, página 124, ISSN: 1743-422X, todo el documento.	12,13,21,22
A	TRANG, P. et al., 'Developing RNase P ribozymes for gene-targeting and antiviral therapy.', CELLULAR MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 6, No. 6, páginas 499-508, ISSN: 1462-5814, todo el documento.	1-22
A	WO 9323569 A1 (RIBOZYME PHARM INC) 25.11.1993, todo el documento.	1-22
A	WO 2007052046 A1 (KING'S COLLEGE LONDON) 10.05.2007, todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.11.2010

Examinador  
J. Vizán Arroyo

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.11.2010

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones (9,12) (en parte),13,(14-18) (en parte), 21 **SI**  
(en parte), 22  
Reivindicaciones 1-8, 9 (en parte), 10, 11, (12, 14-18) (en **NO**  
parte), 19, 20, (21) (en parte)

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones **SI**  
Reivindicaciones (9,12) (en parte), 13, (14-18) (en parte), **NO**  
21 (en parte), 22

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SABARIEGOS, R. et al., 'Catalytic RNase P RNA from <i>Synechocystis</i> sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon.', FEBS LETTERS, 2004, Vol. 577, No. 3, paginas 517-522, ISSN: 0014-5793, Resultados, apartados 3.2., 3.3. y 3.4.; Discusion.	
D02	SERRANO, P. et al., 'Characterization of a cyanobacterial RNase P ribozyme recognition motif in the IRES of foot-and-mouth disease virus reveals a unique structural element', RNA, 2007, Vol. 13, No. 6, paginas 849-859, ISSN: 1355-8382, Resultados; Discusion.	
D03	VIOQUE, A., 'Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria.', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1992, Vol. 20, No.23, paginas 6331-6337, ISSN: 0305-1048, Resultados, Figura 3.	
D04	PASCUAL, A. et al., 'Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and <i>Escherichia coli</i> are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors.', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, 1999, Vol. 96, No.12, paginas 6672-6677, ISSN: 0027-8424, Resultados; Discusion.	
D05	FLETCHER, S. P. et al., 'Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: Elements in the 5' untranslated region important for IRES function', JOURNAL OF VIROLOGY, 2002, Vol. 76, No. 10, paginas 5024-5033, ISSN: 0022-538X, Resultados y Discusion.	
D06	MOES, L. et al., 'The internal initiation of translation in bovine viral diarrhea virus RNA depends on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon', VIROLOGY JOURNAL, 2007, Vol. 4, paginas 124, ISSN: 1743-422X, todo el documento.	
D07	TRANG, P. et al., 'Developing RNase P ribozymes for gene-targeting and antiviral therapy.', CELLULAR MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 6, No. 6, paginas 499-508, ISSN: 1462-5814, todo el documento.	
D08	WO 9323569 A1 (RIBOZYME PHARM INC)	25.11.1993
D09	WO 2007052046 A1 (KING'S COLLEGE LONDON)	10.05.2007

En D1-D2 se divulga la capacidad de la ribonucleasa P (RNasa P) de la cianobacteria *Synechocystis* sp. de procesar el ARN viral del Flaviviridae HCV ("hepatitis C virus") y del Picornaviridae FMDV ("foot-and-mouth disease virus").

En D3 se analiza el gen codificador de la subunidad ARN de la RNasa P de cianobacterias.

En D4 se analiza la ribozima de RNasa P de *Synechocystis* sp.

En D5-D6 se estudias las secuencias correspondiente a los sitios IRES de los Pestivirus CSFV ("classical swine fever virus") y BVDV ("bovine viral diarrhea virus").

En D7-D9 se analiza la aplicación de las ribozimas RNasa P en terapia antiviral.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes)**

**1.1. Reivindicación independiente 1.**

1.1.1. En los documentos D1 y D2 se divulga la capacidad de la ribonucleasa P (RNasa P) de la cianobacteria *Synechocystis* sp. de catalizar in vitro cortes específicos en transcritos derivados del Flaviviridae HCV ("hepatitis C virus") y del Picornaviridae FMDV ("foot-and-mouth disease virus") (cf. D1: Resultados (apartados 3.2., 3.3. y 3.4.); Discusion. D2: Resultados; Discusion). En D3 se describe la secuencia del gen codificador de la subunidad ARN de la ribozimas RNasa P de cianobacterias, en particular, la perteneciente a *Synechocystis* sp. es idéntica a la secuencia SEQ ID No 1 de la invención (cf. D3: Resultados, Figura 3). En D4 se analiza las propiedades enzimáticas de la ribozima de RNasa P de *Synechocystis* sp. (cf. D4: Resultados; Discusion).

Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes dependientes 2-8, 9 (parcialmente), 10-11, (12, 14-18) (parcialmente), 19-20, 21 (parcialmente) se considera que no es nuevo sobre la base de los documentos D1-D4.

1.2. La presente solicitud no satisface los criterios establecidos en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-8, 9 (parcialmente), 10-11, (12, 14-18) (parcialmente), 19-20, 21 (parcialmente) no es nuevo inventiva de acuerdo con el Arts. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1 en combinación con las reivindicaciones dependientes (9, 12) (en parte), 13, (14-18) (en parte), 21 (en parte) y 22.

2.1.1. Se considera que los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En ellos se RNasa P de *Synechocystis* sp. y su acción catalítica sobre transcritos de diferentes virus.

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de las reivindicación independiente 1 en combinación con las reivindicaciones dependientes indicadas puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos usos de RNasa P de *Synechocystis* sp.

2.1.3. La solución propuesta es la inhibición de la replicación de virus pertenecientes a las diferentes familias y/o géneros virales enunciados en las reivindicaciones 9, 12-18, 21 y 22. Dicha solución se basa en el hecho de que la RNasa P de *Synechocystis* sp. ejerce su acción catalítica mediante el reconocimiento de motivos estructurales específicos en el genoma de los virus considerados (c.f. página 3, líneas 29-34). En particular, RNasa P de *Synechocystis* sp. corta el genoma de HCV y de FMDV en el sitio IRES ("Internal ribosome entry site") de los virus indicados (cf. D1: Resultados, apartado 3.3. D2: Resultados). La iniciación de la transcripción genómica mediada por IRES es un mecanismo compartido por virus de diferentes familias y/o géneros entre los que se incluyen Flaviviridae y Picornaviridae. En concreto, los virus CSFV y BVDV de la familia Flaviviridae, caracterizados de manera particular en la solicitud de patente, comparten con el virus HCV las características estructurales de los sitios IRES (cf. D5 y D6). Por consiguiente, sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1 y D2, junto con los conocimientos habituales en este campo de la técnica, recogidos en D3-D9, se concluye que la solución propuesta por la solicitud al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por esta razón, el objeto de la reivindicación independiente 1 en combinación con las reivindicaciones dependientes (9, 12) (en parte), 13, (14-18) (en parte), 21 (en parte) y 22 se considera que no es inventivo.

2.3. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones (9,12) (en parte),13, (14-18) (en parte), 21 (en parte), 22 no tiene actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.