



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 312 347**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/45 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/115 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00941614 .0**

(96) Fecha de presentación : **16.06.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1194564**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

(54) Título: **Vacunas atenuadas químéricas humano-bovino del virus parainfluenza (PIV).**

(30) Prioridad: **09.07.1999 US 143134 P**

(73) Titular/es: **The Government of the United States of America, as represented by The Department of Health and Human Services 6011 Executive Boulevard, Suite 325 Rockville, Maryland 20852, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(72) Inventor/es: **Schmidt, Alexander, C.; Skiadopoulos, Mario, H.; Collins, Peter L.; Murphy, Brian, R.; Bailly, Jane, E. y Durbin, Anna, P.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 312 347 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas atenuadas químéricas humano-bovino del virus parainfluenza (PIV).

5 Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos, No. de Serie 60/143.134, presentada por Bailly *et al.* el 9 de julio de 1999.

10 Antecedentes de la invención

El virus paragripal humano tipo 3 (HPIV3) es una causa común de graves infecciones del tracto respiratorio inferior en lactantes y niños menores de un año. Es el segundo después del virus respiratorio sincitial (RSV) como causa de hospitalización por enfermedad viral del tracto respiratorio inferior en este grupo de edad (Collins *et al.*, en B. 15 N. Fields Virology, p. 1205-1243, 3rd ed., vol. I., Knipe *et al.*, eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996; Crowe *et al.*, Vaccine13: 415-421, 1995; Marx *et al.*, J. Infect. Dis. 176: 1423-1427, 1997). Las infecciones por este virus producen una morbilidad sustancial en niños menores de 3 años. El HPIV1 y el HPIV2 son los principales agentes etiológicos de la laringotraqueobronquitis (obstrucción laringea) y también pueden causar neumonías y bronquiolitis graves (Collins *et al.*, 1996, *cita anterior*). En un estudio a largo plazo durante un periodo de 20 años, los HPIV1, 20 HPIV2, y HPIV3 se identificaron como agentes etiológicos responsables del 6,0, 3,2, y 11,5%, respectivamente, de las hospitalizaciones por enfermedad del tracto respiratorio que representan en total el 18% de las hospitalizaciones, y, por esta razón, existe la necesidad de una vacuna eficaz (Murphy *et al.*, Virus Res. 11: 1-15, 1988). Los virus paragripales han sido identificados también en una importante proporción de casos de derrames del oído medio inducidos viralmente en niños con otitis media (Heikkinen *et al.*, N. Engl. J. Med. 340: 260-264, 1999). Por tanto, existe la necesidad 25 de producir una vacuna contra estos virus que pueda prevenir la grave enfermedad del tracto respiratorio inferior y la otitis media que acompañan a estas infecciones por HPIV. Los HPIV1, HPIV2, y HPIV3 son serotipos definidos que no provocan una inmunidad significativa de protección cruzada. Los antígenos mayores protectores de los PIV son la hemaglutinina (HN) y las glucoproteínas de fusión (F), que median en la unión, penetración y liberación del virus. La protección frente a la reinfección está mediada principalmente por los anticuerpos neutralizantes del virus.

30 A pesar de los considerables esfuerzos realizados para desarrollar terapias vacunales eficaces contra el HPIV, todavía no se han conseguido agentes vacunales aprobados que eviten la enfermedad relacionada con el HPIV. Las perspectivas más prometedoras hasta la fecha son las vacunas de virus vivos atenuados ya que éstas han demostrado ser eficaces en los primates no humanos incluso en presencia de anticuerpos transferidos pasivamente, una situación 35 experimental que simula los que están presentes en el lactante muy joven que tiene anticuerpos adquiridos de la madre (Crowe *et al.*, 1995, *cita anterior*; y Durbin *et al.*, J. Infect. Dis. 179: 1345-1351, 1999a). Dos PIV3 vivos, atenuados, candidatos para la vacuna, uno sensible a la temperatura (ts) derivado de la cepa JS de PIV3 natural (denominado PIV3cp45) y una cepa de PIV3 bovino (BPIV3), están en evaluación clínica (Karron *et al.*, Pediatr. Infect. Dis. J. 15: 650-654, 1996; Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*; Karron *et al.*, 1995b, *cita anterior*). El BPIV3, candidato para 40 la vacuna, es atenuado, genéticamente estable e inmunógeno en lactantes humanos y en niños. Un segundo PIV3, candidato para la vacuna, el JS cp45, es un mutante adaptado al frío, de la cepa JS natural (wt) de HPIV3 (Karron *et al.*, 1995b, *cita anterior*; y Belshe *et al.*, J. Med. Virol. 10: 235-242, 1982a). Este PIV3 vivo, atenuado, pasado por frío (cp), candidato para la vacuna, presenta los fenotipos de sensibilidad a la temperatura (ts), de adaptación al frío (ca), y de atenuación (att), que son estables después de la replicación viral *in vivo*. El virus cp45 es protector frente 45 a la exposición a PIV3 humano en animales experimentales y es atenuado, genéticamente estable, e inmunógeno en lactantes humanos y niños seronegativos (Belshe *et al.*, 1982a, *cita anterior*; Belshe *et al.*, Infect. Immun. 37: 160-165, 1982b; Clements *et al.*, J. Clin. Microbiol. 29: 1175-1182, 1991; Crookshanks *et al.*, J. Med. Virol. 13: 243-249, 1984; Hall *et al.*, Virus Res. 22: 173-184, 1992; Karron *et al.*, 1995b, *cita anterior*). Puesto que estos virus PIV3 candidatos para la vacuna son de origen biológico, no hay ningún método probado para ajustar su nivel de atenuación tanto como 50 sería necesario para una amplia aplicación clínica.

Para facilitar el desarrollo de los PIV candidatos para la vacuna, la tecnología del DNA recombinante ha hecho posible recientemente recuperar virus infecciosos con RNA de cadena negativa a partir del cDNA (para revisiones, véase Conzelmann, J. Gen. Virol. 77: 381-389, 1996; Palese *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 11354-11358, 55 1996). En este contexto, se ha descrito el rescate de virus recombinantes para el virus respiratorio sincitial infeccioso (RSV), el virus de la rabia (RaV), el virus 5 de los monos (SV5), el virus de Rinderpest, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus del sarampión (MeV), el virus de la parotiditis (MuV) y el virus Sendai (SeV) a partir de RNA antigenómico codificado por cDNA en presencia de proteínas víricas esenciales (véase, por ejemplo, Garcin *et al.*, EMBO J. 14: 6087-6094, 1995; Lawson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 4477-4481, 1995; Radecke *et al.*, EMBO J. 14: 5773-5784, 1995; Schnell *et al.*, EMBO J. 13: 4195-4203, 1994; Whelan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 8388-8392, 1995; Hoffman *et al.*, J. Virol. 71: 4272-4277, 60 1997; Kato *et al.*, Genes to Cells1: 569-579, 1996; Roberts *et al.*, Virology 247: 1-6, 1998; Baron *et al.*, J. Virol. 71: 1265-1271, 1997; Publicación internacional No. WO 97/06270; Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567, 1995; solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 08/892.403, presentada el 15 de julio de 65 1997 (correspondiente a la solicitud internacional publicada No. WO 98/02530 y con prioridad sobre las solicitudes provisionales de Estados Unidos Nos. 60/047.634, presentada el 23 de mayo de 1997, 60/046.141, presentada el 9 de mayo de 1997, y 60/021.773, presentada el 15 de julio de 1996); solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/291.894, presentada el 13 de abril de 1999; solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de

ES 2 312 347 T3

Serie 60/129,006, presentada el 13 de abril de 1999; solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/143.097, presentada por Bucholz *et al.* el 9 de julio de 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.* 71: 5814-5819, 1997; He *et al.* *Virology* 237: 249-260, 1997; Peters *et al.* *J. Virol.* 73: 5001-5009, 1999; Whitehead *et al.*, *Virology* 247: 232-239, 1998a; Whitehead *et al.*, *J. Virol.* 72: 4467-4471, 1998b; Jin *et al.* *Virology* 251: 206-214, 1998; Bucholz *et al.* *J. Virol.* 73: 251-259, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.* 73: 3438-3442, 1999, y Clarke *et al.*, *J. Virol.* 74: 4831-4838, 2000).

En un aspecto más específico, se desarrolló recientemente un método para producir HPIV con un fenotipo wt a partir de cDNA, para recuperación de la cepa JS de HPIV3 recombinante, infecciosa, (véase, por ejemplo, Durbin *et al.*, *Virology* 235: 323-332, 1997a; solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/083.793, presentada el 22 de mayo de 1998; solicitud provisional de Estados Unidos No. de Serie 60/047.575, presentada el 23 de mayo de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/53078), y solicitud provisional de Estados Unidos No. de Serie 60/059.385, presentada el 19 de septiembre de 1997). En adición, estas descripciones admiten la manipulación genética de clones de cDNA vírico para determinar la base genética de los cambios fenotípicos en mutantes biológicos, por ejemplo, cuyas mutaciones en el virus HPIV3 cp45 especifican sus fenotipos ts, ca y att, y cuyos gen o genes o segmentos genómicos de BPIV3 especifican su fenotipo de atenuación. Adicionalmente, estas descripciones y las descripciones relacionadas hacen posible construir nuevos PIV candidatos para vacunas que tienen un amplio rango de mutaciones diferentes y evaluar su nivel de atenuación, inmunogenicidad y estabilidad fenotípica (véanse también, solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/143.134, presentada por Bailly *et al.* el 9 de julio de 1999; y solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/350.821, presentada por Durbin *et al.* el 9 de julio de 1999).

Así, el PIV3 recombinante, natural, infeccioso (r)PIV3, así como una serie de sus derivados, se han recuperado ahora a partir de cDNA, y se han utilizado sistemas de genética reversa para generar virus infecciosos que llevan mutaciones atenuantes definidas y para estudiar la base genética de atenuación de los virus de vacuna existentes. Por ejemplo, se ha visto que las tres sustituciones de aminoácidos encontradas en el gen L de cp45, individualmente o en combinación, especifican los fenotipos ts y de atenuación. En otras regiones del PIV3 cp45, están presentes mutaciones ts y atenuantes adicionales. En adición, se ha generado un PIV1 químérico, candidato para la vacuna, utilizando el sistema de rescate del cDNA de PIV3 reemplazando los campos de lectura abiertos (ORFs) de HN y F de PIV3 con los del PIV1 en un cDNA de PIV3 de longitud completa que contiene las tres mutaciones atenuantes en L. El virus químérico recombinante derivado de este cDNA se denomina rPIV3-1.cp45L (Skiadopoulos *et al.*, *J. Virol.* 72: 1762-1768, 1998; Tao *et al.*, *J. Virol.* 72: 2955-2961, 1998; Tao *et al.*, *Vaccine* 17: 1100-1108, 1999). El rPIV3-1.cp45L era atenuado en los hámster e indujo un alto nivel de resistencia al enfrentamiento con PIV1. Se ha producido un virus químérico recombinante, denominado rPIV3-1.cp45, que contiene 12 de las 15 mutaciones de cp45, esto es, que excluye las mutaciones que tienen lugar en HN y F, y que es altamente atenuado en el tracto respiratorio superior e inferior de los hámster (Skiadopoulos *et al.*, *Vaccine* 18: 503-510, 1999a).

El BPIV3, que está antigenéticamente relacionado con el HPIV3, ofrece una propuesta alternativa para el desarrollo de una vacuna de virus vivos atenuados para HPIV1, HPIV2, y HPIV3. La primera vacuna utilizada en los seres humanos, el virus vaccinia vivo que se consideraba de origen bovino, fue desarrollada por Jenner hace casi 200 años para el control de viruela. Durante los dos siglos siguientes, el virus vaccinia tuvo éxito para controlar esta enfermedad y desempeñó un papel esencial en la erradicación final de la viruela. En esta propuesta "Jenneriana" para el desarrollo de la vacuna, se utilizó como vacuna para los seres humanos un virus animal relacionado antigenéticamente. Los virus animales que se adaptan bien a su hospedador natural, a menudo no se replican con eficiencia en los seres humanos y por tanto son atenuados. Actualmente, existe una falta de entendimiento sólido de la base genética para esta forma de restricción del rango de hospedadores. La evolución de un virus en su hospedador mamífero o aviar tiene como resultado una significativa divergencia de las secuencias de nucleótidos (nt) y de aminoácidos con las correspondientes secuencias en el virus humano relacionado. Esta secuencia divergente, que consiste en un gran número de diferencias de la secuencia, especifica el fenotipo de atenuación del rango de hospedadores. Tener un fenotipo de atenuación que se basa en numerosas diferencias de secuencia es una propiedad deseable en un virus vacunal puesto que esto contribuiría a la estabilidad del fenotipo de atenuación del virus animal después de su replicación en los seres humanos.

El rotavirus cuadrivalente recientemente autorizado es un ejemplo del método Jenneriano de desarrollo de una vacuna en el que se ha encontrado que una cepa de rotavirus no humano, el rotavirus rhesus (RRV), es atenuada en los seres humanos y es protectora frente al serotipo 3 humano con el que está muy relacionada antigenéticamente (Kapikian *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* 327: 59-69, 1992). Puesto que existía la necesidad de una vacuna multivalente que pudiera inducir resistencia frente a cada uno de los cuatro principales serotipos de rotavirus humano, se modificó el método Jenneriano construyendo tres virus reordenados utilizando técnicas genéticas convencionales de reordenamiento genético en cultivo de tejidos. Cada virus reordenado con gen individual contenía 10 genes de RRV más un único gen de rotavirus humano que codificaba el principal antígeno de neutralización (VP7) de los serotipos 1, 2, o 4. Se intentó preparar la sustitución de un único gen de los RRV reordenados con las características de atenuación de este virus de simio y la especificidad de neutralización de los serotipos de rotavirus humano 1, 2, o 4. La vacuna cuadrivalente basada en la restricción del rango de hospedadores del RRV simio en los seres humanos proporcionó un alto nivel de eficacia frente a la infección por rotavirus humano en lactantes y niños pequeños (Perez-Schael *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 337: 1181-1187, 1997). Sin embargo, el virus de la vacuna retiene una reactogenicidad media en los lactantes seronegativos más mayores que carecen de anticuerpos maternales, por lo tanto se está desarrollando una segunda generación de vacuna Jenneriana, basada en la cepa UK de rotavirus bovino, para reemplazar a la vacuna de RRV (Clements-Mann *et al.*, *Vaccine* 17: 2715-2725, 1999).

El método Jenneriano se está explorando también para desarrollar vacunas para el virus paragripal tipo 1 y para el virus de la hepatitis A que son atenuados e inmunógenos en primates no humanos (Emerson *et al.*, J. Infect. Dis. 173: 592-597, 1996; Hurwitz *et al.*, Vaccine 15: 533-540, 1997). Se utilizó el método Jenneriano para el desarrollo de una vacuna viva atenuada para el virus de la gripe A pero falló para producir de forma consistente una vacuna atenuada para uso en los seres humanos (Steinhoff *et al.*, J. Infect. Dis. 163: 1023-1028, 1991). Como otro ejemplo, los virus reordenados que contienen dos segmentos génicos que codifican las glucoproteínas de superficie hemaglutinina y neuraminidasa procedentes de un virus de la gripe A humana y los seis segmentos génicos restantes procedentes de virus A de la gripe aviar fueron atenuados en los seres humanos (Clements *et al.*, J. Clin. Microbiol. 27: 219-222, 1989; Murphy *et al.*, J. Infect. Dis. 152: 225-229, 1985; y Snyder *et al.*, J. Clin. Microbiol. 23: 852-857, 1986). Esto indica que uno o más de los seis segmentos génicos del virus aviar atenuaban los virus de la gripe A aviar-humana para los seres humanos. Los determinantes genéticos de esta atenuación fueron cartografiados utilizando virus reordenados que tienen un único segmento genético procedente de la atenuación de un virus de la gripe A aviar y los genes restantes procedentes de una cepa humana. Se demostró que las polimerasas (PB1, PB2) no estructurales (NS), y los genes M contribuían al fenotipo de atenuación de los virus de la gripe A aviar en los seres humanos (Clements *et al.*, J. Clin. Microbiol. 30: 655-662, 1992).

En otro estudio, la grave restricción del rango de hospedadores del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) para la replicación en chimpancés se alivió sólo ligeramente reemplazando las glucoproteínas F y G de BRSV con sus homólogas de HRSV. Esto indica que las F y G están implicadas en esta restricción del rango de hospedadores, pero que también están implicados uno o más genes adicionales del RSV bovino (Buchholz *et al.*, J. Virol. 74: 1187-1199, 2000). Esto ilustra que más de un gen puede contribuir de forma imprevisible al fenotipo de restricción del rango de hospedadores de un virus mamífero o aviar en los primates.

La presente invención proporciona una nueva base para atenuar un virus parental natural o mutante para uso como una vacuna frente a HPIV, en la que la atenuación se basa completamente o en parte en los efectos del rango de hospedadores, mientras que al menos uno o más de los determinantes mayores antigenicos de la neutralización y protección del virus químico es homólogo con el virus frente al cual se dirige la vacuna. Las proteínas HN y F de BPIV3 están relacionadas cada una aproximadamente en un 80% por la secuencia de aminoácidos con sus correspondientes proteínas de HPIV3 (Suzu *et al.*, Nucleic Acids Res. 15: 2945-2958, 1987) y relacionadas en un 25% por análisis antigenico (Coelingh *et al.*, J. Virol. 64: 3833-3843, 1990; Coelingh *et al.*, J. Virol. 60: 90-96, 1986; van Wyke Coelingh *et al.*, J. Infect. Dis. 157: 655-662, 1988). Los estudios previos indicaron que dos cepas de BPIV3, la cepa Kansas (Ka) y la cepa prototípica de la fiebre del transporte (SF), eran atenuadas para el tracto respiratorio superior e inferior de los monos rhesus, y una de éstas, la cepa Ka, era atenuada en los chimpancés (van Wyke Coelingh *et al.*, 1988, *cita anterior*). La inmunización de primates no humanos con el virus Ka indujo anticuerpos reactivos con HPIV3 e indujo resistencia a la replicación del virus humano en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos (id). La subsiguiente evaluación de la cepa Ka en los seres humanos indicó que el virus era satisfactoriamente atenuado para los lactantes seronegativos, y retenía el fenotipo de atenuación después de replicación en lactantes y niños totalmente susceptibles (Karron *et al.*, 1996, *cita anterior*; y Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*). Sus principales ventajas por tanto fueron que estaba satisfactoriamente atenuado para los lactantes y niños seronegativos totalmente susceptibles, y que su fenotipo de atenuación era estable después de replicación en los seres humanos.

Sin embargo, el nivel de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación sérica, reactivos con HPIV3, inducidos en los vacunados seronegativos que recibieron $10^{5.0}$ dosis₅₀ infecciosas de cultivo de tejidos (TCID)₅₀ de la cepa Ka de BPIV3 fue 1:10,5, que era tres veces más bajo que el de vacunados similares que recibieron una vacuna de HPIV3 viva atenuada (Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*; y Karron *et al.*, 1995b, *cita anterior*). Este nivel más bajo de anticuerpos frente al virus humano inducidos por BPIV3 reflejó en gran parte la divergencia antigenica entre HPIV3 y BPIV3 (Karron *et al.*, 1996, *cita anterior*; y Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*). No se han realizado estudios para determinar la eficacia de la cepa Ka, candidato para la vacuna, frente a HPIV3 en los seres humanos, pero es probable que este reducido nivel de anticuerpos reactivos con HPIV3 se refleje en un nivel reducido de eficacia protectora.

Aunque es claro que el BPIV3 tiene genes para el rango de hospedadores que restringen la replicación en el tracto respiratorio de los monos rhesus, chimpancés y seres humanos, permanecen desconocidas cuales de las proteínas o secuencias no codificadoras bovinas contribuyen a esta restricción de la replicación por el rango de hospedadores. Es posible que cualquiera de las proteínas o secuencias no codificadoras de BPIV3 puedan conferir un fenotipo del rango de hospedadores. No es posible determinar con anticipación qué genes o segmentos genómicos conferirán un fenotipo de atenuación. Esto sólo se puede conseguir por la sustitución sistemática con secuencias codificadoras y no codificadoras de BPIV3 de sus homólogas de HPIV3 y por la evaluación de los virus químicos recuperados HPIV3/BPIV3 en monos rhesus o seres humanos seronegativos.

A pesar de los numerosos avances hacia el desarrollo de agentes vacunales efficaces frente a PIV serotipos 1, 2, y 3, sigue existiendo una clara necesidad en la técnica de dispositivos y métodos adicionales para construir vacunas seguras y efficaces para aliviar los graves problemas de salud atribuibles al PIV, particularmente las enfermedades entre lactantes y niños debidas a la infección por HPIV. Entre los desafíos pendientes en este contexto, está la necesidad de dispositivos adicionales para generar candidatos para vacunas inmunógenos, adecuadamente atenuados, y genéticamente estables, para uso en diversas situaciones clínicas. Para facilitar estas metas, se deben ampliar los métodos existentes para identificar e incorporar mutaciones atenuantes a las cepas de vacuna recombinante. Además, se reconoce que se pueden implementar métodos y composiciones para diseñar vacunas frente al PIV humano así como

diseñar nuevos candidatos para vacunas de uso veterinario. Sorprendentemente, la presente invención satisface estas necesidades y proporciona ventajas adicionales como se describe aquí más adelante.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención proporciona virus paragripales (PIVs) quiméricos humano-bovinos que son infecciosos y atenuados en los seres humanos y otros mamíferos. En aspectos relacionados, la invención proporciona nuevos métodos para diseñar y producir PIVs quiméricos humano-bovinos atenuados, que son útiles en diferentes composiciones para generar una respuesta inmunitaria deseada frente a PIV en un hospedador susceptible a la infección por PIV.
- 10 Dentro de estos aspectos de la invención están incluidas nuevas moléculas de polinucleótidos aisladas, y vectores que incorporan tales moléculas que comprenden un genoma o antigenoma de PIV quimérico incluyendo un genoma o antigenoma "de fondo" de PIV parcial o completo, humano o bovino, combinado o integrado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos de un virus PIV diferente. También se proporcionan dentro de la invención métodos y composiciones que incorporan PIV quiméricos humano-bovinos para la profilaxis y el tratamiento de la infección por PIV.
- 15

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende un genoma o antigenoma de virus paragripal (PIV) quimérico que incluye un genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo, de un PIV humano combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos de uno o más PIV diferentes para formar un genoma o antigenoma de PIV quimérico humano-bovino en el que al menos uno de los genes o segmentos genómicos heterólogos codifica una proteína mayor de la nucleocápsida (N) del PIV bovino.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un virus paragripal (PIV) quimérico humano-bovino infeccioso, que comprende una proteína mayor de la nucleocápsida (N), una fosfoproteína de la nucleocápsida (P), una proteína polimerasa de gran dimensión (L), y un genoma o antigenoma quimérico humano-bovino codificado por el polinucleótido.

25 Preferiblemente, el PIV quimérico comprende además uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos adicionales que codifican una o más proteínas N, P, C, D, V, M, F, HN y/o L de PIV o fragmentos de las mismas.

30 Preferiblemente, dichos uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos incluyen un marco de lectura abierto completo (ORF) de una o más proteínas N, P, C, D, V, M, F, HN y/o L de PIV.

35 Preferiblemente, dichos uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos incluyen un elemento regulador heterólogo que comprende una región extrágénica de cabeza 3' o de cola 5', una señal de partida del gen, una señal de final del gen, un sitio de edición de RNA, una señal de encapsidación, una región intergénica, o una región no codificadora en 3' o 5'.

40 Preferiblemente, un gen o segmento genómico heterólogo o bien sustituye a un gen o segmento genómico homólogo en un genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo;

45 se añade de forma adyacente a una región o dentro de una región no codificadora del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo;

se añade o sustituye en una posición correspondiente a una posición de orden del gen natural, de un gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo; o bien

50 se añade o sustituye en una posición que está más próxima al promotor o más distante del promotor en comparación con una posición de orden del gen natural, de un gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo.

Preferiblemente, el genoma o antigenoma quimérico codifica una glucoproteína químérica.

55 Preferiblemente, el genoma o antigenoma de PIV quimérico humano-bovino codifica una glucoproteína químérica que tiene un ectodominio de glucoproteína de HPIV, un determinante antigénico o un epítopo inmunógeno.

Preferiblemente, el segmento genómico heterólogo codifica un ectodominio de glucoproteína.

60 Preferiblemente, el genoma o antigenoma quimérico se modifica además por adición o sustitución de uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos adicionales procedentes de un PIV humano dentro del genoma o antigenoma quimérico, para aumentar la estabilidad genética o alterar la atenuación, la reactogenicidad o el crecimiento en cultivo del virus quimérico.

65 Preferiblemente, el genoma o antigenoma se modifica además por introducción de una o más mutaciones atenuantes identificadas en un PIV mutante de origen biológico u otro virus mutante no segmentado, con RNA de cadena negativa.

ES 2 312 347 T3

Preferiblemente, las mutaciones atenuantes, una o más, se estabilizan mediante cambios múltiples de nucleótidos en un codón que especifica la mutación.

Preferiblemente, el genoma o antigenoma incorpora al menos una y hasta un complemento entero de mutaciones

- 5 atenuantes que especifican una sustitución de aminoácido en la proteína L en una posición correspondiente a Tyr 942, Leu 992, o Thr 1558 de JS; en la proteína N en una posición correspondiente a los residuos Val 96 o Ser 389 de JS; en la proteína C, en una posición correspondiente a Ile 96 de JS; en la proteína M, en una posición correspondiente a Pro 199 de JS; en la proteína F, en una posición correspondiente a los residuos Ile 420 o Ala 450 de JS; en la proteína HN, en una posición correspondiente al residuo Val 384 de JS; una sustitución de nucleótido en una secuencia líder en 3' 10 del virus químérico en una posición correspondiente al nucleótido 23, 24, 28, o 45 de JS cp45; y/o una mutación en 15 una secuencia de partida del gen N en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS cp45.

Preferiblemente, una mutación atenuante adicional altera uno o más de los genes N, P, C, D, V, M, F, HN y/o L de PIV y/o una región de cabeza en 3', de cola en 5', un sitio de edición de RNA, una señal de encapsidación y/o una 15 región intergénica.

Preferiblemente, uno o más genes del genoma o antigenoma químérico se delecionan en su totalidad o en parte o la expresión de los genes se reduce o se elimina por una mutación en un sitio de edición de RNA, por una mutación 20 por desplazamiento del marco de lectura, por una mutación que altera un aminoácido especificado por un codón de iniciación, o por introducción de uno o más codones de terminación en un marco de lectura abierto (ORF) del gen.

Preferiblemente, se introduce una modificación en el genoma o antigenoma químérico que comprende una delección parcial o completa de uno o más ORF de C, D y/o V o uno o más cambios de nucleótidos, que reduce o elimina la expresión de dichos uno o más ORF de C, D y/o V.

25 Preferiblemente, el genoma o antigenoma químérico se modifica para codificar una molécula no PIV seleccionada entre una citocina, un epítopo ayudador de los linfocitos T, un marcador de sitio de restricción, o una proteína de un patógeno microbiano capaz de provocar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero hospedador.

30 Preferiblemente, el genoma o antigenoma químérico comprende además uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican uno o más determinantes antigénicos de uno o más patógenos heterólogos.

Preferiblemente, el genoma o antigenoma de fondo es un genoma o antigenoma de HPIV3 parcial o completo y 35 los genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican los determinantes antigénicos son de uno o más HPIVs heterólogos.

Preferiblemente, el patógeno heterólogo se selecciona entre el virus del sarampión, los virus sincitiales respiratorios 40 subgrupo A y subgrupo B, el virus de la parotiditis, los virus del papiloma humano, los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2, los virus del herpes simple, el citomegalovirus, el virus de la rabia, el virus de Epstein Barr, los filovirus, los buniavirus, los flavivirus, los alfavirus y los virus de la gripe.

Preferiblemente, uno o más determinantes antigénicos se seleccionan de los genes o segmentos genómicos de HPIV1 o HPIV2 que codifican una o más glucoproteínas HN y/o F o dominios antigénicos, fragmentos o epítopes de 45 las mismas y se añaden o se incorporan dentro del genoma o antigenoma de fondo de HPIV3 parcial o completo.

Preferiblemente, ambos genes de HPIV1 que codifican las glucoproteínas HN y F, sustituyen a los genes homólogos HN y F de HPIV3 en un genoma o antigenoma de fondo de HPIV3 para formar un genoma o antigenoma de HPIV3-1 químérico que se modifica después por adición o incorporación de uno o más genes o segmentos genómicos que codifican uno o más determinantes antigénicos de HPIV2.

50 Preferiblemente, se añade al genoma o antigenoma químérico una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HN o F de HPIV2.

Preferiblemente, dichos uno o más determinantes antigénicos heterólogos se seleccionan entre las proteínas HA y 55 F del virus del sarampión, las proteínas F, G, SH y M2 del virus sincitial respiratorio subgrupo A o subgrupo B, las proteínas HN y F del virus de la parotiditis, la proteína L1 del virus del papiloma humano, la proteína gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 o tipo 2, las proteínas gB, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, y gM del virus del herpes simple y citomegalovirus, la proteína G del virus de la rabia, la proteína gp350 del virus de Epstein Barr, la proteína G de filovirus, la proteína G de buniavirus, las proteínas E y NS1 de flavivirus y la proteína E de alfavirus, y 60 los dominios antigénicos, fragmentos y epítopes de las mismas.

Preferiblemente, el patógeno heterólogo es el virus del sarampión, y el determinante o determinantes antigénicos heterólogos se seleccionan entre las proteínas HA y F del virus del sarampión, y los dominios antigénicos, fragmentos y epítopes de las mismas.

65 Preferiblemente, se añade una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HA del virus del sarampión, a un genoma o antigenoma químérico que comprende un genoma o antigenoma de fondo de HPIV3.

ES 2 312 347 T3

Preferiblemente, el PIV quimérico incorpora un gen o segmento genómico procedente del virus sincitio respiratorio (RSV).

Preferiblemente, el gen o segmento genómico procedente del RSV codifica una glucoproteína F y/o G de RSV o dominios inmunógenos o epítopos de la misma.

Preferiblemente, el PIV quimérico es un virus o una partícula subviral.

Preferiblemente, uno o más genes de las glucoproteínas HN y/o F de HPIV están sustituidos por sus genes homólogos de las glucoproteínas HN y/o F de BPIV en el genoma o antigenoma quimérico.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunógena para provocar una respuesta inmunitaria frente a PIV que comprende una cantidad inmunogénicamente suficiente del PIV quimérico en un vehículo fisiológicamente aceptable.

Preferiblemente, la composición inmunógena se formula en una dosis de 10^3 a 10^7 PFU.

Preferiblemente, la composición inmunógena se formula para administración al tracto respiratorio superior por pulverización, gotitas o aerosol.

Preferiblemente, el PIV quimérico provoca una respuesta inmunitaria frente a uno o más virus seleccionados entre HPIV1, HPIV2 y HPIV3.

Preferiblemente, el PIV quimérico provoca una respuesta inmunitaria frente a HPIV3 y otro virus seleccionado entre HPIV1 y HPIV2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende un polinucleótido que codifica un genoma o antigenoma de un PIV quimérico.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una partícula de PIV químérica atenuada infecciosa a partir de una o más moléculas de polinucleótido aisladas que codifican dicho PIV, que comprende: la expresión en un lisado celular o libre de células de un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 36 y las proteínas N, P, y L de PIV.

Preferiblemente, el genoma o antigenoma de PIV quimérico y las proteínas N, P, y L son expresados por dos o más vectores de expresión diferentes.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende un promotor de transcripción ligado de forma funcional, una secuencia de polinucleótidos y un terminador de transcripción.

Se describe así un método para desarrollar PIVs vivos atenuados candidatos para la vacuna, basado en quimeras entre HPIVs y BPIV3. Las quimeras se generan utilizando un sistema de recuperación del virus basado en el cDNA. Los virus recombinantes preparados a partir de cDNA se replican independientemente y se propagan de la misma manera que si fueran virus de origen biológico. Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención se preparan por ingeniería recombinante para incorporar secuencias de nucleótidos procedentes de cepas de PIV tanto humanas como bovinas para producir un virus o partícula subviral químérico, infeccioso. De esta manera, los virus candidatos para la vacuna se preparan por ingeniería recombinante para provocar una respuesta inmunitaria frente a PIV en un mamífero hospedador susceptible a la infección por PIV, incluyendo los seres humanos y los primates no humanos. El PIV químérico humano-bovino según la invención puede ser preparado para provocar una respuesta inmunitaria frente a un PIV específico, por ejemplo, HPIV3, o una respuesta poliespecífica frente a múltiples PIVs, por ejemplo, HPIV1 y HPIV3. Se pueden diseñar virus químéricos adicionales de acuerdo con lo expuesto aquí, que sirven como vectores para antígenos de patógenos no PIV, por ejemplo el virus sincitio respiratorio (RSV) o el virus del sarampión.

Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención tomados como ejemplo, incorporan un genoma o antigenoma de PIV químérico que comprende secuencias de polinucleótidos tanto humanas como bovinas, así como una proteína mayor de la nucleocápsida (N), una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, y una proteína polimerasa de gran dimensión (L). Se pueden incluir proteínas adicionales de PIV en diferentes combinaciones para proporcionar un intervalo de partículas subvirales infecciosas, hasta una partícula viral completa o una partícula viral que contiene proteínas supernumerarias, determinantes antigénicos u otros componentes adicionales.

Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención incluyen un genoma o antigenoma “de fondo” de PIV parcial o completo derivado o copiado de una cepa o subgrupo de virus PIV humano combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos de una cepa o subgrupo de virus PIV diferente para formar el genoma o antigenoma de PIV químérico humano-bovino. En aspectos preferidos de la invención, el PIV químérico incorpora un genoma o antigenoma de fondo de PIV humano parcial o completo, combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos procedentes de un PIV bovino.

El genoma o antigenoma de fondo, parcial o completo, actúa típicamente como un esqueleto receptor o vector al cual se importan los genes o segmentos genómicos heterólogos del PIV humano o bovino homólogo. Los genes o segmentos genómicos heterólogos procedentes del PIV homólogo humano o bovino representan los genes o polinucleótidos “donantes” que se combinan con, o se sustituyen dentro del genoma o antigenoma de fondo, para dar un PIV químérico humano-bovino que presenta nuevas características fenotípicas en comparación con uno o ambos de los PIVs contribuyentes. Por ejemplo, la adición o sustitución de genes o segmentos genómicos heterólogos dentro de una cepa de PIV receptora seleccionada puede producir un aumento o reducción en la atenuación, cambios en el crecimiento, alteración de la inmunogenicidad, u otros cambios fenotípicos deseados en comparación con el correspondiente fenotipo o fenotipos del receptor y/o donante utilizado.

Los genes y segmentos genómicos que se pueden seleccionar para utilizar como sustituciones o adiciones heterólogas dentro del PIV químérico humano-bovino de la invención, incluyen genes o segmentos genómicos que codifican las proteínas N, P, C, D, V, M, F, SH (cuando sea apropiado), HN y/o L de PIV o porciones de las mismas. Además, los genes y segmentos genómicos que codifican proteínas no PIV, por ejemplo, una proteína SH que se encuentra en el virus de la parotiditis y en el SV5, se pueden incorporar dentro del PIV humano-bovino de la invención. Las regiones reguladoras, tales como las regiones extragénicas de cabeza 3' o de cola 5', y las regiones de partida del gen, de fin del gen, las regiones intergénicas, o las regiones no codificadoras en 3' o 5', son útiles también como sustituciones o adiciones heterólogas.

Los PIV químéricos humano-bovinos preferidos como candidatos para la vacuna, llevan uno o más de los determinantes mayores antigénicos de HPIV3 en un fondo que está atenuado por la sustitución o adición de uno o más genes o segmentos genómicos de BPIV3. Los antígenos mayores protectores de los PIV son sus glucoproteínas HN y F, aunque también otras proteínas pueden contribuir a una respuesta inmunitaria protectora. En ciertas realizaciones, el genoma o antigenoma de fondo es un genoma o antigenoma de HPIV, por ejemplo, un genoma o antigenoma de fondo de HPIV3, HPIV2, o HPIV1, al cual se añade o en el cual están sustituidos uno o más genes o segmentos genómicos de BPIV, preferiblemente de BPIV3. En un ejemplo de realización descrito más adelante, un ORF del gen N de un BPIV3 sustituye al de un HPIV.

De acuerdo con los métodos de la invención, cualquier gen o segmento genómico de BPIV, individualmente o en combinación con uno o más genes distintos de BPIV, se puede combinar con secuencias de HPIV para llegar a un PIV químérico humano-bovino, candidato para la vacuna. Cualquier HPIV, incluyendo diferentes cepas de un serotipo particular de HPIV, por ejemplo, HPIV3 será un aceptador razonable para atenuar el gen o los genes de BPIV. En general, los genes o segmentos genómicos de HPIV3 seleccionados para inclusión en un PIV químérico humano-bovino para uso como una vacuna frente a PIV humano, incluirán uno o más de los antígenos protectores de HPIV tales como las glucoproteínas HN o F.

En aspectos de la invención que se pueden tomar como ejemplo, el PIV químérico humano-bovino que lleva uno o más genes o segmentos genómicos bovinos presenta un alto grado de restricción del rango de hospedadores, por ejemplo, en modelos mamíferos de infección por PIV humano en el tracto respiratorio, tales como primates no humanos. En las realizaciones que se pueden tomar como modelo, un PIV humano es atenuado por la adición o sustitución de uno o más genes o segmentos genómicos bovinos a un genoma o antigenoma de fondo de PIV humano parcial o completo, por ejemplo, de HPIV3. En un ejemplo, el gen N de HPIV3 está sustituido por el gen N de BPIV3 para dar un nuevo PIV químérico humano-bovino, candidato para la vacuna.

Preferiblemente, el grado de restricción del rango de hospedadores presentado por los PIVs químéricos humano-bovinos, candidatos para la vacuna, de la invención, es comparable al grado de restricción del rango de hospedadores presentado por la respectiva cepa parental o “donante” de BPIV. Preferiblemente, la restricción debería tener un verdadero fenotipo del rango de hospedadores, esto es, debería ser específica para el hospedador en cuestión y no debería restringir la replicación ni la preparación de la vacuna *in vitro* en una línea celular adecuada. Además, el PIV químérico humano-bovino que lleva uno o más genes o segmentos genómicos bovinos provoca un alto nivel de resistencia en hospedadores susceptibles a la infección por PIV. Así, la invención proporciona una nueva base para atenuar una vacuna de virus vivos frente a PIV, que se basa en los efectos del rango de hospedadores debidos a la introducción de uno o más genes o segmentos genómicos procedentes de un PIV heterólogo, por ejemplo, entre HPIV3 y BPIV3.

En aspectos relacionados de la invención, el PIV químérico humano-bovino incorpora uno o más genes heterólogos que codifican las glucoproteínas HN y/o F de HPIV. Alternativamente, el PIV químérico puede incorporar uno o más segmentos genómicos que codifican un ectodominio (y alternativamente un dominio citoplasmático y/o un dominio transmembranal), o epítopo inmunógeno de las glucoproteínas HN y/o F de un HPIV. Estas proteínas, dominios y epítopos inmunógenos son particularmente útiles en el PIV químérico humano-bovino porque generan nuevas respuestas inmunitarias en un hospedador inmunizado. En particular, las proteínas HN y F, y los dominios y epítopos inmunógenos de ellas, proporcionan antígenos mayores protectores.

El PIV químérico humano-bovino puede incorporar adicionalmente un gen o segmento genómico que codifica una proteína inmunógena, un dominio o epítopo de proteína procedente de múltiples cepas de PIV humano, por ejemplo dos proteínas HN o F o porciones inmunógenas de las mismas cada una de un HPIV diferente, por ejemplo, HPIV1 o HPIV2. Alternativamente, una glucoproteína o determinante inmunógeno puede ser proporcionado a partir de un primer HPIV, y una segunda glucoproteína o determinante inmunógeno puede ser proporcionado a partir de un segundo HPIV mediante sustitución sin la adición de un polinucleótido que codifica una glucoproteína o determinante extra,

al genoma o antigenoma. La sustitución o adición de glucoproteínas y determinantes antigenicos de HPIV se puede conseguir también mediante la construcción de un genoma o antigenoma que codifica una glucoproteína quimérica en el virus o partícula subviral recombinante, por ejemplo que tiene un epítopo inmunógeno, región antigenica o ectodomio completo de un primer HPIV fusionado con un dominio citoplasmático de un HPIV heterólogo. Por ejemplo, un segmento genómico heterólogo que codifica un ectodomio de glucoproteína a partir de una glucoproteína HN o F de HPIV1 o HPIV2 se puede unir con un segmento genómico que codifica un endodomio citoplasmático correspondiente de una glucoproteína HN o F de HPIV3 en el genoma o antigenoma de fondo.

En realizaciones alternativas, un genoma o antigenoma de PIV químérico humano-bovino puede codificar una glucoproteína químérica, sustituta, extra, o un determinante antigenico de la misma en el virus o partícula subviral, para dar un recombinante viral que tiene glucoproteínas, dominios de glucoproteína, o epítopos inmunógenos, tanto humanos como bovinos.

Así, según los métodos de la invención, se puede construir el PIV químérico humano-bovino haciendo que el gen o segmento genómico heterólogo sustituya a un gen o segmento genómico homólogo en un genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial. Alternativamente, se puede añadir el gen o segmento genómico heterólogo may como un gen o segmento genómico supernumerario en combinación con un genoma o antigenoma de fondo de PIV completo (o parcial si está delecionado otro gen o segmento genómico). Por ejemplo, se pueden incluir dos genes HN o F o segmentos genómicos de PIV humano, uno de cada HPIV2 y HPIV3.

A menudo, se añade un gen o segmento genómico heterólogo cerca de una posición intergénica dentro de un genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo. Alternativamente, se puede colocar el gen o segmento genómico en otras regiones no codificadoras del genoma, por ejemplo, dentro de las regiones no codificadoras en 5' o 3' o en otras posiciones en las que aparecen nucleótidos no codificadores dentro del genoma o antigenoma parcial o completo. En un aspecto, las regiones reguladoras no codificadoras contienen señales que actúan en *cis* necesarias para una replicación, transcripción, y traducción eficientes, y representan por tanto sitios diana para la modificación de estas funciones mediante la introducción de un gen o segmento genómico heterólogo u otra mutación como se describe aquí.

Se pueden introducir mutaciones atenuantes en las regiones reguladoras que actúan en *cis* para dar, por ejemplo, (1) una atenuación específica del tejido (Gromeier *et al.*, J. Virol. 73: 958-964, 1999; Zimmermann *et al.*, J. Virol. 71: 4145-4149, 1997), (2) un aumento de la sensibilidad al interferón (Zimmermann *et al.*, 1997, *cita anterior*), (3) sensibilidad a la temperatura (Whitehead *et al.*, 1998a, *cita anterior*), (4) una restricción general en el nivel de replicación (Men *et al.*, J. Virol. 70: 3930-3937, 1996; Muster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA88: 5177-5181, 1991), y/o (5) una restricción de la replicación específica del hospedador (Cahour *et al.*, Virology 207: 68-76, 1995). Estas mutaciones atenuantes se pueden conseguir de varias maneras para producir un PIV químérico humano-bovino atenuado, por ejemplo mediante mutaciones puntuales, trueques de secuencias entre virus relacionados, o delecciones de nucleótidos.

En otros métodos alternativos adicionales proporcionados aquí, se puede añadir un gen o segmento genómico heterólogo o se puede sustituir en una posición, correspondiente a una posición de orden del gen natural, de un gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo. En otras realizaciones, el gen o segmento genómico heterólogo es añadido o sustituido en una posición que está más próxima al promotor o más distante del promotor, en comparación con una posición de orden del gen natural, de un gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo, para aumentar o reducir respectivamente, la expresión del gen o segmento genómico heterólogo.

En los aspectos generales de la invención, se pueden añadir genes o segmentos genómicos bovinos o pueden ser sustitutos dentro de un fondo de PIV humano para formar un PIV químérico humano-bovino atenuado.

En los aspectos preferidos, uno o más genes o segmentos genómicos del PIV bovino sustituyen a genes o segmentos genómicos homólogos dentro de un genoma o antigenoma de fondo de PIV humano.

De un modo paralelo, los PIV químéricos humano-bovinos de la invención se pueden diseñar fácilmente como "vectores" para incorporar determinantes antigenicos de diferentes patógenos, incluyendo más de una cepa o grupo de PIV (por ejemplo, ambos, PIV3 humano y PIV1 humano), virus sincitial respiratorio (RSV), sarampión y otros patógenos (véase, por ejemplo, la solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/170,195, presentada el 10 de diciembre de 1999 por Murphy *et al.*)

En combinación con los efectos fenotípicos del rango de hospedadores proporcionados en el PIV químérico humano-bovino de la invención, a menudo es deseable ajustar el fenotipo de atenuación introduciendo mutaciones adicionales que aumentan o reducen la atenuación del virus químérico. Así, en aspectos adicionales de la invención, se producen PIV químéricos humano-bovinos atenuados, en los que el genoma o antigenoma químérico se modifica además introduciendo una o más mutaciones atenuantes que especifican un fenotipo de atenuación en el virus o partícula subviral resultante. Estas pueden incluir mutaciones en las secuencias reguladoras del RNA o en las proteínas codificadas. Estas mutaciones atenuantes se pueden generar *de novo* y se pueden ensayar en cuanto a los efectos atenuantes según un diseño racional de estrategia de mutagénesis. Alternativamente, las mutaciones atenuantes se pueden identificar en los PIV mutantes de origen biológico existentes y después se pueden incorporar a un PIV químérico humano-bovino de la invención.

ES 2 312 347 T3

La introducción de mutaciones atenuantes y otras mutaciones que especifican el fenotipo deseado en el PIV químérico bovino-humano de la invención se puede llevar a cabo transfiriendo un gen o segmento genómico heterólogo, por ejemplo, un gen que codifica una proteína L o una porción de la misma, a un genoma o antigenoma de fondo de PIV humano. Alternativamente, la mutación puede estar presente en el genoma o antigenoma de fondo seleccionado,

5 y el gen o segmento genómico heterólogo introducido puede no incluir mutaciones o puede incluir una o más mutaciones diferentes. Típicamente, el genoma o antigenoma humano de fondo o "receptor" se modifica en uno o más sitios correspondientes a un sitio de mutación en un virus heterólogo (por ejemplo, un PIV heterólogo humano o un virus de RNA de cadena negativa, no PIV) para contener o codificar la misma mutación o una mutación conservadoramente relacionada (por ejemplo, una sustitución conservadora de aminoácidos) como la identificada en el virus donante 10 (véase, PCT/US00/09695 presentada el 12 de abril de 2000 y su prioridad, solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/129.006, presentada el 13 de abril de 1999).

Las cepas de PIV mutantes preferidas para identificar e incorporar mutaciones atenuantes en el PIV químérico bovino-humano de la invención, incluyen mutantes pasados por frío (cp), adaptados al frío (ca), con restricción del 15 rango de hospedadores (hr), de placas pequeñas (sp), y/o mutantes sensibles a la temperatura (ts), por ejemplo la cepa mutante JS HPIV3 cp 45. En las realizaciones tomadas como ejemplo, tienen lugar una o más mutaciones atenuantes en la proteína-polimerasa L, por ejemplo, en una posición correspondiente a Tyr₉₄₂, Leu₉₉₂, o Thr₁₅₅₈ de JS de HPIV3 natural. Alternativamente, se pueden seleccionar las mutaciones atenuantes en la proteína N y se pueden incorporar 20 a un PIV químérico humano-bovino, que codifican por ejemplo la sustitución o sustituciones de aminoácidos en una posición correspondiente a los residuos Val₉₆ o Ser₃₈₉ de JS. Mutaciones alternativas o adicionales pueden codificar la sustitución o sustituciones de aminoácidos en la proteína C, por ejemplo, en una posición correspondiente a Ile₉₆ de JS y en la proteína M, por ejemplo, en una posición correspondiente a Pro₁₉₉ (por ejemplo una mutación de Pro₁₉₉ a Thr). Otras mutaciones adicionales para ajustar la atenuación de un PIV químérico humano-bovino de la invención se 25 encuentran en la proteína F, por ejemplo, en una posición correspondiente a Ile₄₂₀ o Ala₄₅₀ de JS, y en la proteína HN, por ejemplo, en una posición correspondiente al residuo Val₃₈₄ de JS.

Las mutaciones atenuantes procedentes de mutantes de PIV de origen biológico para incorporación en el PIV químérico humano-bovino de la invención incluyen también mutaciones en porciones no codificadoras del genoma o antigenoma de PIV, por ejemplo en una secuencia líder en 3'. Las mutaciones ejemplares, en este contexto, se pueden preparar en una posición en el líder en 3' de un virus recombinante en una posición correspondiente a los nucleótidos 30 23, 24, 28, o 45 de JS cp45. Otras mutaciones adicionales tomadas como ejemplo se pueden preparar en la secuencia de partida del gen N, por ejemplo cambiando uno o más nucleótidos en la secuencia de partida del gen N, por ejemplo, en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS cp45.

35 A partir de JS cp45 y otros mutantes de PIV y de no PIV de origen biológico, se proporciona un gran "menú" de mutaciones atenuantes, cada una de las cuales se puede combinar con cualquier otra mutación o mutaciones para ajustar el nivel de atenuación en un PIV recombinante que lleva un genoma o antigenoma que es una quimera de los genes o segmentos genómicos humanos y bovinos. Por ejemplo, las mutaciones dentro del PIV recombinante de la invención incluyen una o más, y preferiblemente dos o más, mutaciones de JS cp45. El PIV químérico humano-bovino deseado de la invención seleccionado para uso en vacunas, tiene a menudo como mínimo dos y a veces tres o más 40 mutaciones atenuantes para alcanzar un nivel satisfactorio de atenuación para un amplio uso clínico. Preferiblemente, el PIV químérico humano-bovino recombinante incorpora una o más mutaciones atenuantes estabilizadas mediante múltiples sustituciones de nucleótidos en un codón que especifica la mutación.

45 Las mutaciones adicionales que se pueden adoptar o transferir al PIV químérico humano-bovino de la invención se pueden identificar en virus con RNA de cadena negativa, no segmentados, y no PIV, y se pueden incorporar a los PIV mutantes de la invención. Esto se consigue fácilmente mediante localización genética de la mutación identificada en un virus de RNA de cadena negativa, heterólogo, en un sitio homólogo correspondiente, en un genoma o antigenoma de PIV receptor y haciendo mutar la secuencia existente en el receptor hasta el genotipo mutante (mediante una mutación 50 idéntica o mediante una mutación conservadora), como se describe en PCT/US00/09695 presentada el 12 de abril de 2000 y su prioridad, solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/129.006, presentada el 13 de abril de 1999.

En adición al PIV químérico humano-bovino recombinante, la invención proporciona clones de cDNA relacionados, vectores y partículas, cada uno de los cuales incorpora secuencias de HPIV y BPIV y, opcionalmente, se describen también una o más de las mutaciones adicionales, específicas del fenotipo indicadas aquí. Estas se introducen en combinaciones seleccionadas, por ejemplo, en un polinucleótido aislado que es un genoma o antigenoma de cDNA recombinante, para producir un virus o partícula subviral infeccioso adecuadamente atenuado, después de expresión, según los métodos descritos aquí. Este procedimiento, acoplado con la evaluación fenotípica de rutina, proporciona un PIV químérico humano-bovino que tiene las características deseadas tales como atenuación, sensibilidad a la temperatura, alteración de la inmunogenicidad, adaptación al frío, tamaño de placas pequeño, restricción del rango de hospedadores, estabilidad genética, etc. En particular, se seleccionan candidatos para la vacuna que son atenuados pero todavía suficientemente inmunógenos para provocar una respuesta inmunitaria protectora en el mamífero hospedador vacunado.

65 En otros aspectos adicionales de la invención, los PIV químéricos humano-bovinos, con o sin mutaciones adicionales adoptadas, por ejemplo, a partir de un virus mutante atenuado de origen biológico, se construyen para tener modificaciones adicionales de nucleótidos para dar un cambio fenotípico estructural, o funcional deseado. Típicamente,

la modificación de nucleótidos seleccionada especificará un cambio fenotípico, por ejemplo un cambio en las características de crecimiento, atenuación, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, tamaño de placas, restricción del rango de hospedadores, o inmunogenicidad. Los cambios estructurales en este contexto incluyen la introducción o eliminación de sitios de restricción en los PIV que codifican los cDNA para facilidad de manipulación e identificación.

5 En las realizaciones preferidas, los cambios de nucleótidos dentro del genoma o antigenoma de un PIV químérico humano-bovino incluyen la modificación de un gen viral por delección parcial o completa del gen o reducción o inactivación (*knock-out*) de su expresión. Estas modificaciones se pueden introducir dentro del genoma o antigenoma de fondo, humano, o se pueden introducir en el genoma o antigenoma químérico por incorporación dentro de los genes 10 o segmentos genómicos heterólogos añadidos o sustituidos en él. Los genes objetivos para la mutación en este contexto incluyen cualquiera de los genes de PIV, incluyendo la proteína N de la nucleocápsida, la fosfoproteína P, la subunidad L polimerasa de gran dimensión, la proteína M de la matriz, la proteína HN de la hemaglutinina-neuraminidasa, la proteína SH hidrófoba pequeña, cuando sea aplicable, la proteína F de fusión, y los productos de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de C, D y V. Para que el virus recombinante permanezca viable e infeccioso, cada una de estas 15 proteínas puede ser deleticada, sustituida o reordenada selectivamente, en todo o en parte, sola o en combinación con otras modificaciones deseadas, para obtener nuevos mutantes por delección o inactivación (*knock out*). Por ejemplo, uno o más de los genes C, D, y/o V, pueden ser deleticados en todo o en parte, o su expresión reducida o eliminada (por ejemplo, por la introducción de un codón de terminación, por una mutación en un sitio de edición de RNA, por una mutación que altera el aminoácido especificado por un codón de iniciación, o por una mutación por desplazamiento 20 del marco en los ORF objetivos. En una realización, se puede preparar una mutación en el sitio de edición que evita la edición y elimina la expresión de las proteínas cuyo mRNA es generado por edición del RNA (Kato *et al.*, *EMBO J.* 16: 578-587, 1997a y Schneider *et al.*, *Virology* 227: 314-322, 1997). Alternativamente, uno o más de los ORF de C, D, y/o V pueden ser deleticados en todo o en parte para alterar el fenotipo del clon recombinante resultante para mejorar 25 el crecimiento, la atenuación, la inmunogenicidad u otras características fenotípicas deseadas (véase, la solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/350,821, presentada por Durbin *et al.* el 9 de julio de 1999).

Modificaciones alternativas de nucleótidos en el PIV químérico humano-bovino incluyen una delección, inserción, adición o reordenamiento de una secuencia reguladora que actúa en *cis*, para un gen seleccionado en el genoma o antigenoma recombinante. Como con otras modificaciones de este tipo descritas aquí, estas modificaciones pueden ser 30 introducidas dentro del genoma o antigenoma de fondo, humano, o pueden ser introducidas en el genoma o antigenoma químérico por incorporación dentro de los genes o segmentos genómicos heterólogos añadidos o sustituidos en él. En un ejemplo, una secuencia reguladora que actúa en *cis* de un gen de PIV es cambiada para corresponder a una secuencia reguladora heteróloga, que puede ser una secuencia reguladora homóloga que actúa en *cis* del mismo gen en un PIV diferente, o una secuencia reguladora que actúa en *cis* de un gen diferente de PIV. Por ejemplo, una señal de final de 35 un gen puede ser modificada por la conversión o sustitución en una señal de final de un gen, de un gen diferente en la misma cepa de PIV. En otras realizaciones, la modificación de nucleótidos puede comprender una inserción, delección, sustitución, o reordenamiento de un sitio de iniciación de la traducción dentro del genoma o antigenoma recombinante, por ejemplo, para eliminar un sitio de iniciación de la traducción alternativa para una forma seleccionada de una 40 proteína.

Además, se puede producir una variedad de otras alteraciones genéticas en el genoma o antigenoma de un PIV químérico humano-bovino, solas o junto con una o más mutaciones atenuantes adoptadas a partir de un PIV mutante de origen biológico. Por ejemplo, se pueden insertar en todo o en parte, genes o segmentos genómicos procedentes de 45 fuentes no PIV. Alternativamente, el orden de los genes puede ser cambiado, o un promotor del genoma de PIV puede ser reemplazado con su antigenoma homólogo. Se pueden hacer modificaciones diferentes o adicionales en el genoma o antigenoma recombinante para facilitar las manipulaciones, tales como la inserción de sitios de restricción únicos en diferentes regiones no codificadoras o en otros sitio. Las secuencias del gen no traducidas se pueden separar para aumentar la capacidad para insertar secuencias extrañas.

En otros aspectos adicionales, las moléculas de polinucleótidos o los vectores que codifican el genoma o antigenoma de PIV químérico humano-bovino pueden ser modificados para codificar secuencias no PIV, por ejemplo, una citocina, un epítopo ayudador T, un marcador de sitio de restricción, o una proteína o epítopo inmunógeno de un patógeno microbiano (por ejemplo, virus, bacteria, parásito, u hongo) capaz de provocar una respuesta inmunitaria protectora en el hospedador a que se dirige. En una de tales realizaciones, se construyen PIV químéricos humanobovinos que incorporan un gen o segmento genómico procedente de un virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo 55 un gen que codifica una proteína antigénica (por ejemplo, una proteína F o G), un dominio inmunógeno o epítopo de RSV.

En aspectos relacionados de la invención, se proporcionan composiciones (por ejemplo, polinucleótidos aislados 60 y vectores que incorporan un cDNA que codifica PIV) y métodos para producir un PIV químérico humano-bovino, infeccioso, aislado. Dentro de estos aspectos de la invención se incluyen nuevas moléculas de polinucleótidos aisladas y vectores que incorporan tales moléculas que comprenden el genoma o antigenoma de un PIV químérico humano-bovino. También se proporciona el mismo o diferente vector de expresión que comprende una o más moléculas de polinucleótidos aisladas que codifican las proteínas N, P, y L. Estas proteínas se pueden expresar también directamente a partir del cDNA del genoma o antigenoma. El vector o vectores se expresan o coexpresan preferiblemente en un lisado celular o libre de células, produciendo de este modo una partícula viral o partícula subviral de PIV químérico humano-bovino infeccioso.

ES 2 312 347 T3

Los métodos y composiciones anteriores para producir PIV quimérico humano-bovino dan partículas virales o subvirales infecciosas, o derivados de las mismas. Un virus infeccioso recombinante es comparable a la partícula del virus PIV auténtico y es infeccioso tal cual. Puede infectar directamente a las células frescas. Una partícula subviral infecciosa es típicamente un subcomponente de la partícula de virus que puede iniciar una infección en condiciones apropiadas.

5 Por ejemplo, una nucleocápsida que contiene el RNA genómico o antigenómico y las proteínas N, P, y L, es un ejemplo de una partícula subviral que puede iniciar una infección si se introduce en el citoplasma de las células. Las partículas subvirales proporcionadas dentro de la invención incluyen partículas virales que carecen de una o más proteínas, segmentos de proteínas, u otros componentes virales, que no son esenciales para la infectividad.

10 En otros ejemplos, se describe un lisado celular o libre de células que contiene un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido aislada que comprende el genoma o antigenoma de un PIV quimérico humano-bovino como se ha descrito antes, y un vector de expresión (el mismo vector o diferente) que comprende una o más moléculas de polinucleótido aisladas que codifican las proteínas N, P, y L de PIV. Una o más de estas proteínas pueden ser expresadas también a partir del cDNA del genoma o antigenoma. Despues de expresión, el genoma o antigenoma y las N, P y L se combinan para producir un virus o partícula subviral de PIV quimérico humano-bovino infeccioso.

15 Los PIVs químéricos humano-bovinos de la invención son útiles en diferentes composiciones para generar una respuesta inmunitaria deseada frente a PIV en un hospedador susceptible a la infección por PIV. Los PIV químéricos humano-bovinos recombinantes son capaces de provocar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero hospedador infectado, pero todavía son suficientemente atenuados como para no causar síntomas inaceptables de una enfermedad respiratoria grave en el hospedador inmunizado. Además, los PIV químéricos humano-bovinos recombinantes se deben replicar con suficiente eficiencia *in vitro* para fabricar una preparación de vacuna viable. El virus o partícula subviral atenuados pueden estar presentes en el sobrenadante de un cultivo celular, y pueden ser aislados del cultivo, y purificados parcial o completamente. El virus también puede ser liofilizado, y se puede combinar con una variedad de otros componentes para conservación o administración a un hospedador, según se desee.

20 También se describen nuevas vacunas que comprenden un vehículo y/o adyuvante fisiológicamente aceptable y un virus o partícula subviral de PIV químérico humano-bovino, atenuado, aislado. La vacuna puede estar compuesta de un PIV químérico humano-bovino que tiene al menos una, y preferiblemente dos o más mutaciones adicionales u otras modificaciones de nucleótidos como se ha descrito antes para conseguir un equilibrio adecuado entre atenuación e inmunogenicidad. La vacuna puede ser formulada en una dosis de 10^3 a 10^7 PFU de virus atenuados. La vacuna puede comprender un PIV químérico humano-bovino atenuado que provoca una respuesta inmunitaria frente a una única cepa de PIV o frente a múltiples cepas o grupos de PIV. A este respecto, el PIV químérico humano-bovino se puede combinar en las formulaciones de vacunas con otras cepas vacunales de PIV, o con otros virus de vacunas víricas tales como RSV.

25 También se describe un método para estimular el sistema inmunitario para provocar una respuesta inmunitaria frente a PIV en un mamífero. El método comprende administrar una formulación de una cantidad inmunológicamente suficiente de un PIV químérico humano-bovino en un vehículo y/o adyuvante fisiológicamente aceptable.

30 La composición inmunógena puede ser una vacuna que comprende un PIV químérico humano-bovino que tiene al menos una, y preferiblemente dos o más mutaciones atenuantes u otras modificaciones de nucleótidos que especifican un fenotipo deseado como se ha descrito antes. La vacuna puede ser formulada en una dosis de 10^3 a 10^7 PFU de virus atenuados. La vacuna puede comprender virus PIV químérico humano-bovino atenuado que provoca una respuesta inmunitaria frente a un único PIV, frente a múltiples PIVs, por ejemplo, HPIV1 y HPIV3, o frente a uno o más PIV y un patógeno no PIV tal como RSV. En este contexto, el PIV químérico humano-bovino puede provocar una respuesta inmunitaria monoespecífica o una respuesta inmunitaria poliespecífica frente a múltiples PIVs, o frente a uno o más PIV y un patógeno no PIV tal como RSV. Alternativamente, el PIV químérico humano-bovino que tiene diferentes características inmunógenas se puede combinar en una vacuna mixta o administrar por separado en un protocolo de tratamiento coordinado para producir una protección más efectiva frente a un PIV, frente a múltiples PIVs, o frente a uno o más PIV y un patógeno no PIV tal como RSV. Preferiblemente la composición inmunógena se administra al tracto respiratorio superior, por ejemplo, por pulverización, gotitas o aerosol.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 ilustra la clonación de la región codificadora N de las cepas Ka o SF de PIV bovino en HPIV3. En la Fig. 1A-C, el marco de lectura abierto (ORF) de N de BPIV3 reemplaza a su correspondiente secuencia de HPIV3 en el cDNA antigenómico de rJS de longitud completa (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*). Los genes N de Ka y SF de BPIV3 se amplificaron en primer lugar por la RT-PCR utilizando técnicas estándar de biología molecular a partir del RNA del virión y se subclonaron como fragmentos de 1,9 kb en pBluescript para dar pBS-KaN o pBS-SFN, respectivamente. El gen N de rJS HPIV3 fue subclonado como un fragmento MluI/EcoRI de 1,9 kb en pUC 119 a partir de un plásmido que contiene la mitad 5' del antigenoma rJS HPIV3 (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*; solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/083.793, presentada el 22 de mayo de 1998; solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/047.575, presentada el 23 de mayo de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/53078), y solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/059.385, presentada el 19 de septiembre de 1997) para dar el pUC119JSN. Cada gen N fue modificado mediante mutagénesis dirigida al sitio para situar un sitio NcoI y AflII en los sitios de iniciación y terminación de la traducción, respectivamente. Los genes N de Ka y SF son idénticos en las regiones de los sitios de iniciación y terminación de la traducción y por tanto, se llevaron a cabo idénticas reacciones de

ES 2 312 347 T3

mutagénesis en ambos genes N de BPIV3 como se representa en 1A. Fig. 1B. Después de la digestión con AflII/NcoI, se introdujo un fragmento de 1,5 kb procedente de pBS-KaN o pBS-SFN que representa la región N codificadora de BPIV3, en la ventana NcoI/AflII del subclon N de HPIV3, pUC119JSN-NcoI/AflII, como un reemplazamiento de su homólogo de HPIV3. Fig. 1C. Cada subclon químérico fue sometido entonces a una mutagénesis dirigida al sitio 5 para restaurar la secuencia presente en HPIV3 rJS antes del codón de iniciación de la traducción o después del codón de terminación y la secuencia codificadora de BPIV3 inmediatamente después del codón de iniciación y antes del codón de terminación. Esto dio pUC119B/HKaN y pUC119B/HSFN, que se usaron para importar el gen N de BPIV3 al clon cDNA de HPIV3 como se muestra en la Fig. 2. Figura 1, Panel A, CAAAAATGTTG (SEQ ID NO. 10); GCAACTAACATCGA (SEQ ID NO. 11); TAACCAGGTGA (SEQ ID NO. 12); GCACTTAAGCAC (SEQ ID NO. 13).
10 Figura 1, Panel C, TAACCAGGTGA (SEQ ID NO. 12); GCACTTAAGCAC (SEQ ID NO. 13); CAAAAATGTTGA (SEQ ID NO. 14); GCAACTAGTCGA (SEQ ID NO. 15).

La figura. 2 ilustra la inserción del gen N de HPIV3/BPIV3 (cepa Ka o SF) químérico en el cDNA antigenómico de HPIV3. En la Fig. 2A, el ORF BPIV3 N de Ka o SF flanqueado por la secuencia de HPIV3 fue subclonado 15 como un fragmento MluI/EcoRI de pUC119B/HKaN o de pUC119B/HSFN e insertado en pLeft+2G (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*). El plásmido pLeft+2G contiene la mitad 5' del antigenoma de HPIV3 rJS de los nucleótidos 1-7437 (sentido genoma) detrás de un promotor T7. La localización de dos residuos G que fueron insertados entre el promotor T7 y la secuencia de HPIV3 para mejorar la transcripción está indicada por un asterisco. Fig. 2 B. Un fragmento XhoI/NgoMI de pRight (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*; solicitud de patente de Estados Unidos No. 20 de Serie 09/083.793, presentada el 22 de mayo de 1998; solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/047.575, presentada el 23 de mayo de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/53078), y solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/059,385, presentada el 19 de septiembre de 1997) que contiene el extremo 3' 25 del antigenoma de HPIV3 flanqueado por la ribozima del virus delta de la hepatitis y el terminador T7 fue clonado en la ventana XhoI/NgoMI del plásmido pLeft modificado dando como resultado los plásmidos pB/HPIV3KaN y pB/HPIV3SFN. Cada una de estas construcciones químéricas contiene la secuencia completa de sentido positivo del RNA antigenómico de HPIV3 excepto para la región N codificadora que ha sido reemplazada por su homólogo Ka o SF de BPIV3.

La figura 3 proporciona secuencias de nucleótidos de HPIV3, BPIV3 y virus químéricos de la invención alrededor 30 de los codones de iniciación (A) y de terminación (B) de la traducción N. La posición de los ORF individuales está descrita en los respectivos informes de Genbank (Nº AF178654 para BPIV3 Ka, Nº AF178655 para BPIV3 SF y Nº Z11515).

Las secuencias (sentido positivo) que flanquean los codones de iniciación (A) y de terminación (B) (cada uno subrayado) de la traducción en el gen N se muestran para JS (rJS) de HPIV3 recombinante parental, los virus parentales 35 Ka y SF (Ka y SF) de BPIV3 de origen biológico, y los virus químéricos cKa y cSF. Los residuos específicos del hospedador en las secuencias de virus cKa y cSF y sus homólogos en rJS (antes del codón de iniciación y después del codón de terminación) y SF o Ka (del codón de iniciación hasta el codón de terminación, inclusive) están en letra negrita. El virus químérico purificado en placa fue amplificado por RT-PCR a partir del RNA del virión y fue secuenciado utilizando 40 el kit Taq Dye Deoxi Terminator Cycle kit (ABI, Foster City, CA). Esto confirmó que las secuencias previstas estaban presentes en cada virus químérico. Figura 3A. rJS, GGAACCTCTATAATTCAAAAATGTTGAGCCTATTGATAC (SEQ ID NO. 16). Figura. 3A. cKa y cSF, GGAACCTCTATAATTCAAAAATGTTGAGTCTATTGACAC (SEQ ID NO. 17). Figura 3A. Ka y SF, GAAATCCTAAAGACTGTAATCATGTTGAGTCTATTGACAC (SEQ ID NO. 18). Figura 3B. rJS, TTAACGCATTGGAAGCAACTAATCGAACATTAA (SEQ ID NO. 19). Figura 45 3B. cKa y cSF, TCAGTGCATTGGAAAGCAACTAGTCGAATCAACATTAA (SEQ ID NO. 20). Figura 3B. Ka y SF, TCAGTCATTGGAAAGCAACTAGTCACAAAGAGATGACCA (SEQ ID NO. 21).

La figura 4 detalla la estructura de los virus químéricos BPIV3/HPIV3, y su confirmación por digestión con TaqI de los productos de la RT-PCR generados a partir del RNA del virus. En la Fig. 4A los genomas de los virus químéricos 50 cKa y cSF se muestran esquemáticamente (no a escala) en relación con los de los virus parentales HPIV3 y BPIV3. Las regiones específicas de Ka y SF se indican por sombreado claro y oscuro respectivamente. Las flechas por encima del genoma rJS indican las localizaciones de los cebadores utilizados para la amplificación por RT-PCR de los virus químéricos y parentales para los fines de digestión por TaqI para diagnóstico. Estos cebadores fueron dirigidos a 55 regiones conservadas entre HPIV3 y BPIV3 de forma que pudieran ser utilizados para la amplificación de los virus HPIV3, BPIV3 y BPIV3/HPIV3 químérico. En la Fig. 4B los tamaños esperados de los productos de la digestión por TaqI para cada virus se muestran para un producto de la PCR de 1898 bp amplificado a partir del RNA con el par de cebadores ilustrados en la Fig. 4A. Este producto de la PCR es ilustrado en la parte superior de la Fig. 4B, y el ORF de N está indicado como un rectángulo lleno. Los fragmentos TaqI únicos para cada virus y que por tanto sirven para la identificación del virus están indicados con un asterisco. La Fig. 4C proporciona los perfiles TaqI de los productos 60 de la PCR que contienen la región codificadora N de PIV3 de los virus químéricos cKa (izquierda) o cSF (derecha), flanqueada por los virus parentales HPIV3 y BPIV3. Los fragmentos únicos TaqI para diagnóstico de la identidad del virus y correspondientes a los identificados en (4B) se indican con un asterisco. Se indican las longitudes calculadas (bp) de las bandas en gel de DNA.

65 La Fig. 5 proporciona curvas de crecimiento multiciclo de los virus parentales y químéricos en células MDBK (A) o LLC-MK2 (B). Las monocapas de las células MDBK bovinas (A) o LLC-MK2 (B) de simio en pocillos (9,6 cm² cada uno) de una placa de 6 pocillos, fueron infectadas individualmente en una multiplicidad de infección de 0,01 con el virus parental o químérico indicado. Se realizaron tres infecciones replicadas para cada virus. Se tomaron

ES 2 312 347 T3

muestras en los tiempos indicados, se conservaron a -70°C, y se titularon en paralelo mediante el ensayo de TCID₅₀. Se construyen las curvas de crecimiento utilizando la media de las 3 muestras replicadas en cada tiempo. El límite inferior de detectabilidad del virus fue 10^{1.5} TCID₅₀/ml, que está indicado por una línea de puntos.

5 Las figuras 6A-6G representan la secuencia completa de nucleótidos de sentido positivo (SEQ ID NO. 22) de la cepa Ka de PIV3 bovino.

Las figuras 7A-7G representan la secuencia completa de nucleótidos de sentido positivo (SEQ ID NO. 23) de la cepa SF de PIV3 bovino.

10 La figura 8A proporciona una representación esquemática de los genomas de los virus quiméricos rHPIV3-F_BHN_B y rBPIV3-F_HHN_H, y de sus virus parentales, rHPIV3 JS y BPIV3 Ka (no a escala). Los genes F y HN fueron intercambiados en un único fragmento de restricción entre rHPIV3 y rBPIV3 utilizando los sitios SgrAI y BsiWI que habían sido introducidos delante de las secuencias finales de los genes M y HN, respectivamente.

15 La figura 8B representa el ensamblaje de un cDNA antigenómico para BPIV3 Ka. Se construyó un cDNA de longitud completa para codificar la secuencia antigenómica completa de BPIV3 Ka (GenBank nº de acceso AF178654). El cDNA fue ensamblado a partir de subclones derivados de la transcripción inversa (RT) del (v)RNA viral y de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se secuenciaron múltiples subclones del antigenoma, y 20 solamente los clones que concordaban con la secuencia de consenso de BPIV3 Ka se utilizaron para el ensamblaje del clón de longitud completa, con la excepción del nucleótido 21 y nucleótido 23, que difieren de la secuencia publicada pero aparecen con frecuencia similar en la población de virus.

25 La figura 8C ilustra las características de los genomas de PIV bovino-humano parental y químico. Los genomas de los virus químicos rHPIV3F_BHN_B y rBPIV3F_HHN_H y los de sus virus parentales rHPIV3 JS y BPIV3 Ka se muestran esquemáticamente (no a escala). Se introdujeron dos únicos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción, SgrAI y BsiWI, cerca de los extremos de los genes M y HN, respectivamente. Los virus recombinantes HPIV3 y BPIV3 que llevan estos sitios de restricción introducidos fueron denominados rHPIV3s y rBPIV3s como se indica en la figura 8C2. Los genes de las glucoproteínas fueron intercambiados entre rHPIV3 JS y rBPIV3 Ka. La secuencia de nucleótidos que fue mutagenizada se muestra debajo de cada construcción de cDNA, indicando la posición del primer nucleótido de cada secuencia. Los sitios de restricción SgrAI y BsiWI introducidos están subrayados y los nucleótidos que difieren entre HPIV3 y BPIV3 y por tanto identifican el origen de los insertos del gen están señalados en letra negrita. Figura 8C, Panel 1, rHPIV3 JS, TCCACCGGTGCA (SEQ ID NO. 4), TAGACAAAAGGG (SEQ ID NO. 24). Figura 8C, Panel 1, rBPIV3 Ka, TCCAACATTGCA (SEQ ID NO. 2); AAGATATAAAAGA (SEQ ID NO. 25). Figura 8C, Panel 2 rHPIV3s, CGCACCCGGTGTA (SEQ ID NO. 5); TAGACGTACGGG (SEQ ID NO. 26). Figura 8C, Panel 2, rBPIV3s, TCCACCGGTGCA (SEQ ID NO. 3); AAGACGTACCGGA (SEQ ID NO. 27). Figura 8C, Panel 3, rHPIV3 F_BHN_B, CGCACCCGGTGCA (SEQ ID NO. 28); AAGACGTACGGG (SEQ ID NO. 29). Figura 8C, Panel 3, rBPIV3 F_HHN_H, AAGACGTACGGG (SEQ ID NO. 30); TAGACGTACCGGA (SEQ ID NO. 31).

40 La figura 9 proporciona una confirmación de la identidad de los virus recombinantes mediante la RT-PCR del RNA viral y la digestión por Eco RI. Los productos de la RT-PCR del RNA viral fueron preparados con un par de cebadores que reconocían las regiones conservadas sobre cualquier lado de los genes F y HN en ambos, BPIV3 y HPIV3. La digestión con EcoRI dio como resultado un único patrón de fragmentos de restricción para cada uno de los cuatro virus. En el diagrama esquemático de la izquierda, las líneas horizontales simbolizan las secuencias virales 45 amplificadas y las barras verticales muestran las posiciones de los sitios EcoRI. El tamaño esperado de cada fragmento de restricción está indicado por encima de la línea. Los números debajo de cada línea corresponden a la posición de la secuencia en el RNA antigenómico de BPIV3 Ka, HPIV3 JS (GenBank, número de acceso AF178654 y Z11575), o del derivado químico indicado. A la derecha, se muestra un gel de agarosa al 1% de la digestión por Eco RI de los productos de la PCR, que confirma la identidad de los virus parentales y químicos. Los asteriscos indican las bandas 50 en gel que contienen dos fragmentos de restricción que migran conjuntamente debido a la muy estrecha similitud en tamaño.

La figura 10 representa la replicación multiciclo de los virus químicos y parentales en células LLC-MK2 de simio. La replicación multiciclo (el inóculo de entrada tenía una MOI de 0,01) de los tres virus químicos rHPIV3-F_BHN_B, rBPIV3-F_HHN_H y rHPIV3-N_B (también denominado cKa) se compara con la replicación de sus virus parentales BPIV3 Ka y rHPIV3. Los títulos de virus se muestran como la media del log₁₀ TCID₅₀/ml ± error estándar de muestras triplicadas. El límite inferior de detección de este ensayo es 10 TCID₅₀, como se indica por la línea de puntos horizontal.

60 La figura 11 documenta la media de los títulos de los virus químicos y parentales en frotis nasofaríngeos de monos rhesus infectados, a lo largo de la infección. Los títulos de virus se muestran como la media de TCID₅₀/ml en células LLC-MK2 ± error estándar para los grupos de 4 o 6 monos infectados con el mismo virus. Esto ilustra el mismo experimento que se muestra en la Tabla 3. En el panel A, los títulos medios de rHPIV3-F_BHN_B se comparan con los títulos de rHPIV3 y BPIV3 Ka. En el panel B, los títulos medios de rBPIV3-F_HHN_H se comparan con los de BPIV3 Ka y rHPIV3, que, para los dos últimos virus, son los mismos valores que en el panel A pero se presentan separados para facilitar la comparación. Se excluyeron de las figuras los títulos del día 5 porque eran mucho más bajos que los títulos del día 4 y del día 6, muy probablemente debido a problemas técnicos durante la recogida de muestras.

Descripción de las realizaciones específicas

La presente invención proporciona virus paragripal (PIV) recombinante clonado como una quimera de secuencias genómicas o antigenómicas de PIV humano y bovino para obtener un PIV químérico humano-bovino. La construcción químérica de PIV humano-bovino da una partícula viral o partícula subviral que es infecciosa en los mamíferos, particularmente en los seres humanos, y que es útil para generar composiciones inmunógenas para uso clínico o veterinario. También se proporcionan en la invención nuevos métodos y composiciones para diseñar y producir PIV químérico humano-bovino, atenuado.

Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención se preparan por ingeniería recombinante para incorporar secuencias de nucleótidos tanto de cepas humanas como bovinas de PIV para producir un virus o partícula subviral químérica infecciosa. De esta manera, los virus candidatos para la vacuna se preparan por ingeniería recombinante para provocar una respuesta inmunitaria frente a PIV en un mamífero hospedador susceptible a la infección por PIV, incluyendo los seres humanos y los primates no humanos. El PIV químérico humano-bovino según la invención puede provocar una respuesta inmunitaria a un PIV específico, por ejemplo, HPIV3, o una respuesta poliespecífica frente a múltiples PIV, por ejemplo, HPIV1 y HPIV3.

Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención tomados como ejemplo, incorporan un genoma o antigenoma de PIV químérico que comprende secuencias de polinucleótidos tanto humanas como bovinas, así como una proteína mayor de la nucleocápsida (N), una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, y una proteína polimerasa de gran dimensión (L). Se pueden incluir proteínas adicionales de PIV en diferentes combinaciones para proporcionar un intervalo de partículas subvirales infecciosas, hasta una partícula viral completa o una partícula viral que contiene proteínas supernumerarias, determinantes antigenicos u otros componentes adicionales.

Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención incluyen un genoma o antigenoma "de fondo" de PIV parcial o completo derivado o copiado de una cepa o serotipo de virus PIV humano o bovino combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos de una cepa o serotipo de PIV diferente para formar el genoma o antigenoma de PIV químérico humano-bovino. En ciertos aspectos de la invención, el PIV químérico incorpora un genoma o antigenoma de fondo de PIV humano (HPIV) parcial o completo, combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos procedentes de un PIV bovino.

El genoma o antigenoma de fondo, parcial o completo, actúa típicamente como un esqueleto receptor o vector al que se importan genes o segmentos genómicos heterólogos de un PIV homólogo, humano o bovino. Los genes o segmentos genómicos heterólogos procedentes del PIV homólogo humano o bovino, representan los genes o polinucleótidos "donantes" que se combinan con, o se sustituyen dentro, del genoma o antigenoma de fondo para dar un PIV químérico humano-bovino que presenta nuevas características fenotípicas en comparación con uno o ambos de los PIV contribuyentes. Por ejemplo, la adición o sustitución de genes o segmentos genómicos heterólogos dentro de una cepa seleccionada de PIV receptor puede producir un aumento o reducción en la atenuación, cambios en el crecimiento, alteración de la inmunogenicidad, u otros cambios fenotípicos deseados en comparación con el correspondiente fenotipo o fenotipos del receptor y/o del donante no modificados. Los genes y segmentos genómicos que se pueden seleccionar para uso como insertos o adiciones heterólogas dentro del PIV químérico humano-bovino de la invención incluyen genes o segmentos genómicos que codifican las proteínas N, P, C, D, V, M, SH, cuando sea aplicable, F, HN y/o L de PIV o porciones de las mismas. Las regiones reguladoras, tales como las regiones extragénicas de cabeza o de cola o regiones intergénicas, son útiles también como insertos o adiciones heterólogos.

Los genes o segmentos genómicos heterólogos pueden ser añadidos o sustituidos en una posición, correspondiente a una posición de orden del gen natural, de los genes o segmentos genómicos homólogos dentro del genoma o antigenoma de fondo, de PIV parcial o completo, cuyo gen o segmento genómico homólogo es reemplazado o desplazado de este modo (por ejemplo, hasta una posición más distante del promotor). En otras realizaciones adicionales, el gen o segmento genómico heterólogo es añadido o sustituido en una posición que está más próxima al promotor o más distante del promotor, en comparación con la posición de orden del gen natural, del gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo, lo que mejora o reduce, respectivamente, la expresión del gen o segmento genómico heterólogo.

La introducción de proteínas, dominios y epítitos inmunógenos heterólogos, para producir PIV químérico humano-bovino, es particularmente útil para generar nuevas respuestas inmunitarias en un hospedador inmunizado. La adición o sustitución de un gen o segmento genómico inmunógeno procedente de un PIV donante dentro de un genoma o antigenoma receptor de un PIV diferente, puede generar una respuesta inmunitaria dirigida frente al subgrupo o cepa del donante, el subgrupo o cepa del receptor, o frente a ambos, los subgrupos o cepas del donante y del receptor. Para alcanzar este propósito, el PIV químérico humano-bovino puede ser construido también de modo que exprese una proteína químérica, por ejemplo, un glucoproteína inmunógena que tiene una cola citoplasmática y/o un dominio transmembranal específico para un PIV fusionado a un ectodominio de un PIV diferente para proporcionar, por ejemplo, una proteína de fusión humano-bovina, o una proteína de fusión que incorpora dominios de dos PIV humanos diferentes. En una realización preferida, un genoma o antigenoma de PIV químérico humano-bovino codifica una glucoproteína químérica en el virus o partícula subviral recombinante que tiene ambos dominios o epítitos inmunógenos de la glucoproteína, el humano y el bovino. Por ejemplo, un segmento genómico heterólogo que codifica un ectodominio de la glucoproteína procedente de una glucoproteína HN o F de PIV humano, se puede unir con una secuencia

ES 2 312 347 T3

de polinucleótidos (esto es, un segmento genómico) que codifica la correspondiente glucoproteína citoplasmática HN o F bovina y los dominios transmembranales para formar el genoma o antigenoma del PIV quimérico humano-bovino.

5 En otras realizaciones, el PIV quimérico humano-bovino útil en una formulación de vacuna se puede modificar convenientemente para acomodar una desviación antigénica en el virus circulante. Típicamente la modificación estará en las proteínas HN y/o F. Esto podría implicar la introducción de una o más mutaciones puntuales; podría implicar también que un gen HN o F completo, o un segmento genómico que codifica una de sus regiones inmunógenas particulares, procedente de una cepa o grupo de PIV se incorpore a un cDNA de genoma o antigenoma de PIV 10 quimérico, mediante el reemplazamiento de una región correspondiente en un clon receptor de una cepa o grupo diferente de PIV, o mediante la adición de una o más copias del gen, de tal modo que estén representadas múltiples formas antigénicas. El virusprogenie producido a partir del clon de PIV modificado se puede usar entonces en los protocolos de vacunación frente a cepas emergentes de PIV.

15 El reemplazamiento de una secuencia codificadora o secuencia no codificadora de PIV humano (por ejemplo, un promotor, el final de un gen, el inicio de un gen, un elemento intergénico u otro que actúa en *cis*) con un equivalente heterólogo da un PIV quimérico que tiene una variedad de posibles efectos atenuantes y otros efectos fenotípicos. En particular, el rango de hospedadores y otros efectos deseados surgen de la sustitución con una proteína de PIV bovino o murino (MPIV), de un dominio proteínico, de un gen o segmento genómico importado dentro de PIV humano 20 de fondo, en el que el gen bovino o murino no funciona eficientemente en una célula humana, por ejemplo, por la incompatibilidad de la secuencia o proteína heteróloga con una secuencia o proteína de PIV humano biológicamente interactiva (esto es, una secuencia o proteína que ordinariamente coopera con la secuencia o proteína sustituida para la transcripción, traducción, ensamblaje viral, etc.) o, más típicamente en una restricción del rango de hospedadores, con una proteína celular o algún otro aspecto del medio celular que es diferente entre el hospedador permisivo y el menos 25 permisivo. En realizaciones tomadas como ejemplo, se seleccionan secuencias de PIV bovino para introducción en el PIV humano basándose en aspectos conocidos de la estructura y función del PIV bovino y humano.

El HPIV3 es un miembro del género *Respirovirus* de la familia *Paramyxoviridae* del orden *Mononegavirales* (Collins *et al.*, 1996, *cita anterior*). El HPIV3 es el mejor caracterizado de los HPIV y representa el HPIV prototipo. 30 Su genoma es RNA de una cadena única de sentido negativo de 15462 nucleótidos (nt) de longitud (Galinski *et al.*, Virology165: 499-510, 1988; y Stokes *et al.*, Virus Res. 25: 91-103, 1992). Al menos ocho proteínas son codificadas por el genoma de PIV3: la proteína N de la nucleocápsida, la fosfoproteína P, las proteínas C y D de funciones desconocidas, la proteína M de la matriz, la glucoproteína F de fusión, la glucoproteína HN de la hemaglutinina-neuraminidasa, y la proteína L polimerasa de gran dimensión (Collins *et al.*, 1996, *cita anterior*). También se podría 35 producir una proteína que contiene el ORF de V en el gen P (Durbin *et al.*, Virology261: 319-333, 1999).

Las proteínas M, HN, y F están asociadas a la cubierta, y las dos últimas son glucoproteínas de superficie que, como ocurre con cada PIV, son los antígenos mayores de neutralización y protectores (Collins *et al.*, 1996, *cita anterior*). Se cree que la divergencia significativa de secuencias entre las proteínas HN o F de PIV comparables entre los PIV 40 puede ser la base para el tipo de especificidad de la inmunidad protectora (Collins *et al.*, 1996, *cita anterior*; Cook *et al.*, Amer. Jou. Hyg. 77: 150-159, 1963; Ray *et al.*, J. Infect. Dis. 162: 746-749, 1990).

Los genes de HPIV3 se transcriben cada uno como un único mRNA que codifica una única proteína, con la excepción del mRNA P que contiene cuatro ORF, concretamente P, C, D y V (Galinski *et al.*, Virology186: 543-45 550, 1992; y Spriggs *et al.*, J. Gen. Virol. 67: 2705-2719, 1986). Las proteínas P y C se traducen a partir de los ORF separados, que se solapan, en el mRNA. Mientras que todos los paramyxovirus codifican una proteína P, sólo los miembros del género *Respirovirus* y *Morbillivirus* codifican una proteína C. Los virus individuales varían en el número de proteínas expresadas a partir del ORF de C y en su importancia en la replicación del virus *in vitro* e *in vivo*. El virus Sendai (SeV) expresa cuatro proteínas iniciadas independientemente a partir del ORF de C: C', C, Y1, 50 Y2, cuyos sitios de iniciación de la traducción aparecen en ese orden en el mRNA (Curran, *et al.*, Enzyme44: 244-249, 1990; Lamb *et al.*, en The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, ed., pp. 181-214, Plenum Press, New York, 1991), mientras que el HPIV3 y el virus del sarampión (MeV) expresan solamente una única proteína C (Bellini *et al.*, J. Virol. 53: 908-919, 1985; Sanchez *et al.*, Virology147: 177-86, 1985; y Spriggs *et al.*, 1986, *cita anterior*).

55 La proteína D de PIV3 es una proteína de fusión de los ORF de P y D, y se expresa a partir del gen P por el procedimiento de la edición de RNA de co-transcripción en el cual se añaden al mRNA P, en el sitio de edición del RNA, dos residuos G no codificados en la secuencia génica (Galinski *et al.*, 1992, *cita anterior*; y Pelet *et al.*, EMBO J. 10: 443-448, 1991). El BPIV3, el otro único paramyxovirus que expresa una proteína D, utiliza la edición del RNA para expresar esta proteína así como una segunda proteína; la proteína V.

60 Casi todos los miembros de los géneros *Respirovirus*, *Rubulavirus*, y *Morbillivirus* expresan una proteína V. El único miembro que claramente no lo hace es HPIV1, que carece de un ORF de V intacto (Matsuoka *et al.*, J. Virol. 65: 3406-3410, 1991). El ORF de V se caracteriza por la presencia de un dominio rico en cisteína que está altamente conservado (Cattaneo *et al.*, Cell56: 759-764, 1989; Park *et al.*, J. Virol. 66: 7033-7039, 1992; Thomas *et al.*, Cell54: 65 891-902, 1988; y Vidal *et al.*, J. Virol. 64: 239-246, 1990). El ORF de V se mantiene en cada uno de los virus HPIV3 secuenciados hasta la fecha lo que da a entender que este ORF se expresa y mantiene la función para este virus (Galinski *et al.*, Virology155: 46-60, 1986; Spriggs *et al.*, 1986, *cita anterior*; y Stokes *et al.*, 1992).

La proteína V de BPIV3 es expresada cuando un residuo G, no codificado en la secuencia génica, se añade al sitio de edición del RNA (Pelet *et al.*, 1991, *cita anterior*). Sin embargo, en el caso de HPIV3, hay dos codones de terminación de la traducción entre el sitio de edición y el ORF de V, y no está claro si el HPIV3 representa otro ejemplo en el que no se expresa este ORF, o si se expresa por algún otro mecanismo. Una posibilidad es que la edición 5 del HPIV3 también tenga lugar en un segundo sitio hacia abajo en el gen P, aunque esto no parece que ocurra en el cultivo celular (Galinski *et al.*, 1992, *cita anterior*). Alternativamente, podría ser que los ribosomas tengan acceso al ORF de V por el desplazamiento ribosómico del marco de lectura. Esto podría ser comparable a la situación con el locus P de MV. El MV expresa las proteínas C, P, y V, pero también expresa una nueva proteína R que se sintetiza por desplazamiento del marco de lectura del ORF de P al ORF de V (Liston *et al.*, *J. Virol.* 69: 6742-6750, 1995.). Los 10 indicios genéticos dan a entender que el ORF de V de HPIV3 es funcional (Durbin *et al.*, 1999, *cita anterior*).

Aunque el medio por el que el HPIV3 expresa su proteína V no está claro, la extrema conservación de su ORF de V en diferentes cepas da a entender que esta proteína se expresa realmente. La función de la proteína V no está bien definida, pero se han recuperado MV y SeV recombinantes sin V que se replican eficientemente *in vitro* pero presentan 15 una replicación reducida *in vivo* (Delenda, *et al.*, *Virology* 228: 55-62, 1997; Delenda *et al.*, *Virology* 242: 327-337, 1998; Kato *et al.*, 1997a, *cita anterior*; Kato *et al.*, *J. Virol.* 71: 7266-7272, 1997b; y Valsamakis *et al.*, *J. Virol.* 72: 7754-7761, 1998).

El genoma viral de PIV contiene también las regiones extragénicas líder y tráiler, que tienen todos o parte de los 20 promotores requeridos para la replicación y transcripción viral, así como regiones no codificadoras e intergénicas. Por tanto, el mapa genético de PIV se representa como 3' líder-N-P/C/D/V-M-F-HN-L-5' tráiler. Algunos virus, tales como el virus 5 de simio y el virus de la parotiditis, tienen un gen localizado entre F y HN que codifica una pequeña 25 proteína hidrófoba (SH) de función desconocida. La transcripción se inicia en el extremo 3' y se realiza mediante un mecanismo secuencial de terminación-iniciación que está guiado por motivos poco conservados encontrados en los bordes del gen. El extremo hacia arriba de cada gen contiene una señal de partida del gen (GS), que dirige la iniciación 30 de su respectivo mRNA. El terminal hacia debajo de cada gen contiene un motivo de final del gen (GE) que dirige la poliadenilación y la terminación. Han sido descritas secuencias que sirven como ejemplo, para las cepas JS de PIV3 humano (GenBank número de acceso Z11575,) y Washington (Galinski M. S., en *The Paramyxovirus*, Kingsbury, D. W., ed., pp. 537-568, Plenum Press, New York, 1991,), y para la cepa 910N de PIV3 bovino (GenBank número de acceso D80487).

Como se usa aquí, “gen de PIV” generalmente se refiere a una porción del genoma de PIV que codifica un mRNA y típicamente empieza en el extremo hacia arriba con una señal de partida del gen (GS) y termina en el extremo hacia abajo con una señal de final del gen (GE). El término gen de PIV incluye también lo que se describe como “marco 35 de lectura abierta de la traducción”, o ORF, particularmente en el caso en que una proteína, tal como C, se expresa a partir de un ORF adicional más que desde un único mRNA. Para construir el PIV químérico humano-bovino de la invención, se pueden deletrear, insertar o sustituir en todo o en parte, uno o más genes o segmentos genómicos de PIV. Esto significa que las delecciones, inserciones y sustituciones parciales o completas pueden incluir marcos 40 de lectura abiertos y/o secuencias reguladoras que actúan en *cis* de uno cualquiera o más de los genes o segmentos genómicos de PIV. Por “segmento genómico” se entiende cualquier longitud de nucleótidos continuos del genoma de PIV, que podrían ser parte de un ORF, de un gen, o de una región extragénica, o una combinación de ellos.

La presente invención incluye un método para desarrollar PIV vivos atenuados candidatos para la vacuna, basados 45 en quimeras entre HPIVs y BPIV3. Las quimeras se construyen mediante un sistema de recuperación del virus basado en el cDNA. Los virus recombinantes preparados a partir del cDNA se replican independientemente y se propagan de la misma manera que si fueran virus de origen biológico. Los PIV químéricos humano-bovinos de la invención candidatos preferidos para la vacuna, llevan uno o más de determinantes antigenicos mayores de uno o más PIV 50 humanos, por ejemplo, HPIV1, HPIV2, y/o HPIV3, en un fondo que se atenúa por la sustitución o adición de uno o más genes o segmentos genómicos de BPIV. Los antígenos mayores protectores de los PIV son sus glucoproteínas HN y F, aunque también pueden contribuir a una respuesta inmunitaria protectora otras proteínas.

Así, la invención proporciona una nueva base para atenuar un virus parental natural o mutante para uso como una vacuna frente a PIV, que se basa en los efectos del rango de hospedadores debidos a la introducción de uno o más genes o segmentos genómicos entre HPIV y BPIV. Hay numerosas diferencias en las secuencias de nucleótidos y 55 aminoácidos entre BPIV y HPIV, que se reflejan en diferencias en el rango de hospedadores. Por ejemplo, entre HPIV3 y BPIV3 el porcentaje de identidad de aminoácidos para cada una de las siguientes proteínas es: N (86%), P (65%), M (93%), F (83%), HN (77%), y L (91%). La diferencia del rango de hospedadores se demuestra por el crecimiento altamente permisivo de HPIV3 en los monos rhesus, comparado con la replicación restringida de dos cepas diferentes 60 de BPIV3 en el mismo animal (van Wyke Coelingh *et al.*, 1988, *cita anterior*). Aunque la base de las diferencias del rango de hospedadores entre HPIV3 y BPIV3 está aún por determinar, es probable que incluyan diferencias en más de un gen y en múltiples aminoácidos. La implicación de múltiple genes y posiblemente de secuencias reguladoras 65 que actúan en *cis*, incluyendo cada una diferencias en múltiples aminoácidos o nucleótidos, da una base muy amplia para la atenuación, que no puede ser alterada fácilmente por reversión. Esto contrasta con la situación con otros virus HPIV3 vivos atenuados, que son atenuados mediante una o varias mutaciones puntuales. En este caso, la reversión de cualquier mutación individual puede llevar a una importante readquisición de la virulencia o, en un caso en el que sólo existe una atenuación especificada por un único residuo, a una completa readquisición de la virulencia.

ES 2 312 347 T3

En las realizaciones de la invención que sirven como ejemplo, descritas aquí más adelante, el genoma o antigenoma de fondo es un genoma o antigenoma de HPIV3, y el gen o segmento genómico heterólogo es un ORF de N derivado, alternativamente, de una cepa Ka o SF de BPIV3 (que están relacionadas en un 99% de la secuencia de aminoácidos). El ORF de N del antigenoma de fondo de HPIV3 es sustituido por el ORF de N homólogo de BPIV3 dando un nuevo

- 5 clon recombinante de cDNA de PIV químérico humano-bovino. El reemplazamiento del ORF de HPIV3 N de HPIV3 con el de Ka o SF de BPIV3 da como resultado una proteína con aproximadamente 70 diferencias de aminoácidos (dependiendo de la cepa implicada) frente a la de HPIV3 N. La proteína N es una de las proteínas más conservadas, y la sustitución de otras proteínas tales como P, solas o en combinación, podría resultar en muchas más diferencias de aminoácidos. La implicación de múltiples genes y segmentos genómicos confiriendo cada uno múltiples diferencias

10 de aminoácidos o nucleótidos proporciona una amplia base para una atenuación que es muy estable a la reversión.

Este modo de atenuación contrasta claramente con los actuales candidatos para las vacunas de HPIV que son atenuados mediante una o más mutaciones puntuales, donde la reversión de una mutación individual puede dar una importante o completa readquisición de la virulencia. Además, varias mutaciones puntuales atenuantes de HPIV conocidas, 15 dan típicamente un fenotipo sensible a la temperatura. Un problema con la atenuación asociada con la sensibilidad a la temperatura es que el virus puede estar demasiado restringido para la replicación en el tracto respiratorio inferior mientras que está sub-ateniado en el tracto respiratorio superior. Esto es debido a que hay un gradiente de temperatura dentro del tracto respiratorio, con temperatura que es más alta (y más restrictiva) en el tracto respiratorio inferior y más baja (menos restrictiva) en el tracto respiratorio superior. La capacidad de un virus atenuado para replicarse en el tracto 20 respiratorio superior puede producir complicaciones incluyendo congestión, rinitis, fiebre y otitis media, mientras que la sobreatenuación en el tracto respiratorio inferior puede reducir la inmunogenicidad. Así, la atenuación conseguida únicamente por mutaciones sensibles a la temperatura quizás no es la ideal. En contraste, las mutaciones del rango de hospedadores presentes en el PIV químérico humano-bovino de la invención no conferirán en la mayor parte de los 25 casos sensibilidad a la temperatura. Por tanto, el nuevo método de atenuación de PIV proporcionado por la invención será más estable genéticamente y fenotípicamente y probablemente estará menos asociado con la virulencia residual en el tracto respiratorio superior en comparación con otros PIV candidatos para la vacuna conocidos.

Sorprendentemente, ambos recombinantes químéricos Ka y SF de HPIV3/BPIV3 que incluyen el reemplazamiento de ORF de N fueron viables. Puesto que la proteína N de la cepa Ka o SF de BPIV3 difiere en 70 de 515 residuos 30 aminoácidos, respectivamente, de la proteína de la cepa JS de HPIV3, fue por tanto inesperado que una proteína N bovina con este nivel de divergencia de la secuencia de aminoácidos pudiera interactuar eficientemente con el RNA de HPIV3, o con otras proteínas de HPIV3 que constituyen la replicasa/transcriptasa funcional. Igualmente sorprendente fue el hallazgo de que los virus químéricos Ka y SF se replicaron tan eficientemente en cultivo celular como cualquiera de los HPIV3 o BPIV3 parentales indicando que los recombinantes químéricos no presentaban más incompatibilidades 35 génicas que la restricción de la replicación *in vitro*. Esta propiedad de replicación eficiente *in vitro* es importante porque permite la fabricación eficiente de este producto biológico.

También es sorprendente la observación, basada en los estudios que siguen, de que el Ka y el SF de HPIV3/BPIV3 químéricos recombinantes (denominados cKa y cSF), que llevan solamente un gen bovino, son casi equivalentes a sus 40 BPIV3 parentales en el grado de restricción del rango de hospedadores en el tracto respiratorio del mono rhesus. En particular, los virus cKa y cSF presentaron aproximadamente una reducción de 60 veces o 30 veces, respectivamente, en la replicación en el tracto respiratorio superior de los monos rhesus en comparación con la replicación de HPIV3. Basado en este hallazgo, es posible que otros genes de BPIV3 también confieran niveles deseados de restricción del 45 rango de hospedadores dentro del PIV químérico humano-bovino de la invención. Por tanto, según los presentes métodos, será fácilmente identificada una lista de determinantes atenuantes en genes y segmentos genómicos heterólogos de ambos, HPIV y BPIV que confieran, en combinación apropiada, un nivel óptimo de restricción del rango de hospedadores y de inmunogenicidad en el PIV químérico humano-bovino seleccionado para uso en la vacuna. En las 50 vacunas recombinantes preferidas, la atenuación marcada por la replicación en el tracto respiratorio inferior y/o superior en un modelo animal aceptado para la replicación de PIV en los seres humanos, por ejemplo, hámster o monos rhesus, puede ser reducida al menos aproximadamente 2 veces, más a menudo aproximadamente 5 veces, 10 veces, o 20 veces, y preferiblemente 50-100 veces y hasta 1.000 veces o más globalmente (por ejemplo, cuando se mide a los 3-8 días después de la infección) en comparación con el crecimiento de la correspondiente cepa de PIV parental natural o mutante.

55 Confirmando la naturaleza y ventajas inesperadas proporcionadas por el PIV químérico humano-bovino de la invención, tanto el cKa como el cSF indujeron un alto nivel de protección frente al enfrentamiento con HPIV3 en el tracto respiratorio de monos rhesus, a pesar del excepcional grado de restricción de la replicación presentado por estos virus en este modelo para la infección y protección de PIV humano. En particular, la infección previa con cualquier virus químérico indujo un alto nivel de resistencia a la replicación del virus de enfrentamiento rJS tanto en el tracto 60 respiratorio superior como en el inferior. La infección de los monos con cKa provocó un alto grado de protección como se indica por una reducción aproximada de 300 veces en la replicación de HPIV3 (rJS) natural en el tracto respiratorio superior, y una reducción aproximada de 1000 veces en el tracto inferior en comparación con los monos control no inoculados. Los monos infectados con cSF manifestaron una reducción de 2000 veces en la replicación de rJS en el 65 tracto respiratorio superior, y una reducción de 1000 veces en el tracto inferior en comparación con los monos control no inoculados. Los niveles de protección provocados por cKa o cSF fueron comparables con los vistos en monos previamente infectados con el PIV parental bovino o humano. Así, la infección con PIV químérico humano-bovino de la invención proporciona un alto nivel de protección en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos, y ambos virus químéricos representan prometedores candidatos para la vacuna. En otras vacunas recombinantes prefe-

ridas, la actividad inmunógena del PIV quimérico humano-bovino será sopesada frente al nivel de atenuación para conseguir candidatos para la vacuna útiles, y estará típicamente marcada por una reducción de la replicación del virus de enfrentamiento, por ejemplo, rJS en el tracto respiratorio inferior y/o superior aproximadamente 50-100 veces, 100-500 veces, preferiblemente aproximadamente 500-2.000 veces y hasta 3.000 veces o más globalmente (por ejemplo, 5 cuando se mide a los 3-8 días después del enfrentamiento). Así, los virus de la vacuna recombinante de la invención mantienen la inmunogenicidad a la vez que presentan reducciones concomitantes en la replicación y en el crecimiento. Este sorprendente ensamblaje de rasgos fenotípicos es altamente deseado para el desarrollo de la vacuna.

La observación de que el gen N procedente de dos cepas independientes de BPIV3 confiere un fenotipo de atenuación a HPIV3 para el mono rhesus, indica que ésta es probablemente una propiedad compartida por los genes N de otras cepas de BPIV. Por consiguiente, dentro de los métodos de la invención cualquier gen o segmento genómico de BPIV, solo o en combinación con uno o más de otros genes o segmentos genómicos de BPIV, se puede combinar con las secuencias de HPIV para producir un virus quimérico recombinante HPIV3/BPIV3 atenuado adecuado para uso como virus de la vacuna. En las realizaciones preferidas, todos los HPIV, incluyendo HPIV1, HPIV2, HPIV3 y las 15 cepas variantes de los mismos, son receptores útiles para los genes y/o segmentos genómicos atenuantes de BPIV. En general, los genes de HPIV seleccionados para inclusión en un virus quimérico HPIV3/BPIV3 incluirán uno o más de los antígenos protectores, tales como las glucoproteínas HN o F.

Un PIV quimérico humano-bovino alternativo de la invención contendrá determinantes antigenicos protectores de HPIV1 o HPIV2. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la expresión de un gen HN y/o F de HPIV1 o HPIV2 como un gen o genes extra en un HPIV3/BPIV3 quimérico recombinante atenuado. Alternativamente, es posible utilizar un virus quimérico antigenico HPIV3/HPIV1 o HPIV3/HPIV2, en el cual los genes HN y/o F de HPIV1 o HPIV2 reemplazan a sus homólogos de PIV3 (Skiadopoulos *et al.*, 1999a, *cita anterior*; Tao *et al.*, 1999, *cita anterior*; y solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/083,793, presentada el 22 de mayo de 1998), 25 como un virus receptor o de fondo para uno o más genes o segmentos genómicos bovinos atenuantes heterólogos, por ejemplo un gen o segmento genómico N de Ka o SF. Tales virus químéricos antigenicos serán atenuados por el gen N bovino, pero provocarán inmunidad frente al virus HPIV1 o HPIV2. En este contexto, ha sido generado un PIV1 quimérico candidato para la vacuna, utilizando el sistema de rescate de cDNA de PIV3 reemplazando los marcos de lectura abiertos (ORFs) de HN y F de PIV3 con los de PIV1 en un cDNA de longitud completa de PIV3 que contiene 30 las tres mutaciones atenuantes en L. El virus quimérico recombinante derivado de este cDNA se denomina rPIV3-1.cp45L (Skiadopoulos *et al.*, 1998, *cita anterior*; Tao *et al.*, 1998, *cita anterior*; Tao *et al.*, 1999, *cita anterior*). El rPIV3-1.cp45L fue atenuado en los hámster y provocó un alto nivel de resistencia al enfrentamiento con PIV1. También ha sido producido un virus quimérico recombinante, denominado rPIV3-1cp45, que contiene 12 de las 15 35 mutaciones cp45, esto es, excluyendo las mutaciones en HN y F, y que está altamente atenuado en el tracto respiratorio superior e inferior de los hámster (Skiadopoulos *et al.*, 1999a, *cita anterior*).

Además otros HPIV/BPIV químéricos recombinantes incorporarán dos o más genes o segmentos genómicos de BPIV, en cualquier combinación, hasta incluir todo el genoma del BPIV aparte de los genes seleccionados o determinantes antigenicos seleccionados de los genes y segmentos genómicos HN o F, que podrían proceder de un virus humano HPIV1, HPIV2, o HPIV3. Otras realizaciones adicionales de la invención se dirigen a un PIV quimérico humano-bovino que incorpora genes atenuantes de otros PIV animales, tales como el PIV1 murino, el virus SV5 40 PIV2 canino, u otro PIV aviar o mamífero en combinación con un esqueleto de HPIV, incluyendo alternativamente un esqueleto de HPIV quimérico, procedente de HPIV1, HPIV2, y/o HPIV3.

En otros aspectos detallados de la invención, se emplean PIV químéricos humano-bovinos como vectores para antígenos protectores de patógenos heterólogos, incluyendo otros virus PIV y no PIV y patógenos no virales. Dentro de estos aspectos, el genoma o antigenoma quimérico bovino-humano comprende un "genoma o antigenoma vector" de PIV parcial o completo combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican uno o más determinantes antigenicos de uno o más patógenos heterólogos (véase, por ejemplo, solicitud provisional de 50 patente de Estados Unidos Número de serie 60/170.195, presentada el 10 de diciembre de 1999 por Murphy *et al.*). El patógeno heterólogo en este contexto puede ser un PIV heterólogo y los genes o segmentos genómicos heterólogos se pueden seleccionar para codificar una o más proteínas N, P, C, D, V, M, F, SH (cuando sea aplicable) HN y/o L de PIV, así como los dominios, fragmentos de proteína, y regiones o epítopos inmunógenos. Las vacunas del vector de PIV construidas de este modo, pueden provocar una respuesta inmunitaria poliespecífica y pueden ser administradas simultáneamente o en un protocolo de administración coordinada con otros agentes de vacuna.

En realizaciones de la invención tomadas como ejemplo, el PIV quimérico humano-bovino puede comprender un genoma o antigenoma vector que es un genoma o antigenoma de HPIV parcial o completo, que está combinado con, o está modificado para incorporar, uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican determinantes antigenicos de uno o más PIV heterólogos, incluyendo los HPIV heterólogos seleccionados de HPIV1, HPIV2, o HPIV3. En aspectos más detallados, el genoma o antigenoma vector es un genoma o antigenoma parcial o completo de HPIV3 y los genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican los determinantes antigenicos son de uno o más HPIV heterólogos. Típicamente, el genoma o antigenoma quimérico incorpora uno o más genes o segmentos genómicos de un BPIV que especifica la atenuación.

En los aspectos de la invención tomados como ejemplo, el PIV quimérico bovino-humano incorpora uno o más genes o segmentos genómicos de HPIV1 o HPIV2 que codifican una o más glucoproteínas HN y/o F o dominios antigenicos, fragmentos o epítopos de las mismas dentro de un genoma o antigenoma vector de HPIV3 parcial o

completo. En aspectos más detallados, ambos genes de HPIV1 que codifican las glucoproteínas HN y F sustituyen a los genes homólogos HN y F de HPIV3 para formar un genoma o antigenoma vector de HPIV3-1 químérico. Tales construcciones recombinantes se pueden utilizar para producir directamente virus de vacuna, o se pueden modificar además por adición o incorporación de uno o más genes o segmentos génicos que codifican uno o más determinantes

- 5 antigénicos. Tales construcciones para la producción de virus de vacuna incorporan típicamente uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos de un BPIV que especifica atenuación, por ejemplo un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína atenuante de BPIV, tal como N. Se pueden emplear ciertos PIV químéricos humano-bovinos de la invención como vectores para generar vacunas específicas frente a HPIV2, por ejemplo en las que se añade o se incorpora una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HN
- 10 de HPIV2, dentro de un genoma o antigenoma vector de HPIV3-1 químérico y la construcción químérica es atenuada por la incorporación de un gen o segmento genómico de BPIV.

En más aspectos adicionales de la invención, se proporcionan PIVs químéricos humano-bovinos como vectores para una serie de patógenos no PIV (véase, por ejemplo, la solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/170.195, presentada el 10 de diciembre de 1999 por Murphy *et al.*). El genoma o antigenoma vector para uso dentro de estos aspectos de la invención puede comprender un genoma o antigenoma de HPIV parcial o completo, y el patógeno heterólogo se puede seleccionar entre el virus del sarampión, los virus sincitiales respiratorios subgrupo A y subgrupo B, el virus de la parotiditis, los virus del papiloma humano, los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2, los virus del herpes simple, el citomegalovirus, el virus de la rabia, el virus de Epstein Barr, los filovirus, los buniavirus, los flavivirus, los alfavirus y los virus de la gripe.

Por ejemplo, un genoma o antigenoma vector de HPIV para construir un PIV químérico bovino-humano de la invención puede incorporar determinantes antigénicos heterólogos seleccionados de las proteínas HA y F del virus del sarampión, o dominios antigénicos, fragmentos y epítopos de las mismas. En realizaciones tomadas como ejemplo, una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HA del virus del sarampión se añade o se incorpora dentro de un genoma o antigenoma vector de HPIV3.

Alternativamente, los PIV químéricos bovino-humanos se pueden utilizar como vectores para incorporar determinantes antigénicos heterólogos procedentes del virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo incorporando uno o más genes o segmentos genómicos que codifican las glucoproteínas F y/o G de RSV o dominios inmunógenos o epítopos de las mismas. En este contexto, la clonación del cDNA de RSV y otras descripciones son proporcionadas en la solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. 60/007.083, presentada el 27 de septiembre de 1995; solicitud de patente de Estados Unidos No. 08/720.132, presentada el 27 de septiembre de 1996; solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. 60/046.141, presentada el 9 de mayo de 1997; solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. 60/047.634, presentada el 23 de mayo de 1997; solicitud de patente de Estados Unidos No. 08/892.403, presentada el 15 de julio de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/02530); solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/291.894, presentada el 13 de abril de 1999; solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/129.006, presentada el 13 de abril de 1999; Collins, *et al.*, 1995, *cita anterior*; Bukreyev, *et al.*, J. Virol. 70: 6634-6641, 1996; Juhasz *et al.*, 1997, *cita anterior*; Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*; He *et al.*, 1997, *cita anterior*; Baron *et al.*, 1997, *cita anterior*; Whitehead *et al.*, 1998a, *cita anterior*; Whitehead *et al.*, 1998b, *cita anterior*; Jin *et al.*, 1998, *cita anterior*; y Whitehead *et al.*, 1999, *cita anterior*; y Bukreyev *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA96: 2367-2372, 1999).

45 De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporcionan PIVs químéricos humano-bovinos que incorporan al menos un determinante antigénico procedente de un PIV heterólogo o de un patógeno no PIV. Por ejemplo, uno o más genes o segmentos genómicos individuales de HPIV3 pueden ser reemplazados con genes o segmentos genómicos homólogos procedentes de RSV humano, o se puede insertar o añadir un gen o segmento genómico RSV como gen supernumerario. Alternativamente, un segmento genómico heterólogo, seleccionado, por ejemplo que codifica una cola 50 citoplásrica, un dominio transmembranal o un ectodominio de una glucoproteína de RSV, sustituye a un segmento genómico homólogo, por ejemplo, en el mismo gen en HPIV3 o dentro de un gen diferente en HPIV3, o se añade dentro de una secuencia no codificadora del genoma o antigenoma de HPIV3 para dar una glucoproteína químérica de PIV-RSV. En una realización, un segmento genómico de un gen F de RSV humano sustituye a un segmento genómico de HPIV3 para dar construcciones que codifican proteínas químéricas, por ejemplo proteínas de fusión que tienen una 55 cola citoplásrica y/o un dominio transmembranal de PIV fusionado con un ectodominio de RSV para dar un nuevo virus atenuado, y/o una vacuna multivalente inmunógena frente a ambos, PIV y RSV.

Como se ha indicado antes, a menudo es deseable ajustar el fenotipo de atenuación en el PIV químérico humano-bovino de la invención introduciendo mutaciones adicionales que aumentan o reducen la atenuación o alteran de otra manera el fenotipo del virus químérico. Descripciones detalladas de los materiales y métodos para producir PIV recombinante a partir de cDNA, y para preparar y analizar el intervalo completo de las mutaciones y modificaciones de nucleótidos indicadas aquí como aspectos supplementarios de la presente invención, se encuentran, por ejemplo, en Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*; solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/083.793, presentada el 22 de mayo de 1998; solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/047.575, presentada el 23 de mayo de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/53078), y solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/059.385, presentada el 19 de septiembre de 1997.

ES 2 312 347 T3

En particular, estos documentos describen métodos y procedimientos para llevar a cabo la mutagénesis, el aislamiento y la caracterización de PIV para obtener cepas mutantes atenuadas (por ejemplo, cepas mutantes sensibles a la temperatura (ts), pasadas por frío (cp) adaptadas al frío (ca), de placas pequeñas (sp) y con un rango de hospedadores restringido (hr)) y para identificar los cambios genéticos que especifican el fenotipo atenuado. Conjuntamente con estos métodos, los documentos citados detallan procedimientos para determinar la replicación, inmunogenicidad, estabilidad genética y eficacia protectora de los PIV humanos atenuados de origen biológico y producidos recombinantemente en sistemas de modelos aceptados, incluyendo los sistemas de modelos murinos y de primates no humanos. Además, estos documentos describen métodos generales para desarrollar y analizar composiciones inmunógenas, incluyendo vacunas monovalentes y bivalentes, para profilaxis y tratamiento de la infección por PIV. Los métodos para producir PIV recombinante infeccioso mediante la construcción y expresión de cDNA que codifica un genoma o antigenoma de PIV co-expresado con proteínas esenciales de PIV, están descritos también en los documentos mencionados, que incluyen la descripción de los siguientes ejemplos de plásmidos que se pueden emplear para producir clones virales de PIV infeccioso: p3/7(131) (ATCC 97990); p3/7(131)2G (ATCC 97889); y p218(131) (ATCC 97991); cada uno depositado según los términos del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC) de 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., y que han recibido los números de acceso identificados antes.

También están descritos en las referencias mencionadas antes, métodos para construir y evaluar PIV recombinantes infecciosos que se modifican para incorporar mutaciones específicas del fenotipo identificadas en PIV mutantes de origen biológico, por ejemplo, mutantes pasados por frío (cp), adaptados al frío (ca), con rango de hospedadores restringido (hr), de placas pequeñas (sp), y/o sensibles a la temperatura (ts), por ejemplo la cepa mutante JS HPIV3 cp 45. Otras mutaciones pueden ser atenuantes sin un fenotipo marcador auxiliar. Las mutaciones identificadas en estos mutantes pueden ser adoptadas fácilmente en el PIV químérico humano-bovino. En realizaciones tomadas como ejemplo, una o más mutaciones atenuantes tienen lugar en la proteína L de la polimerasa, por ejemplo, en una posición correspondiente a Tyr₉₄₂, Leu₉₉₂, o Thr₁₅₅₈ de JS cp45. Preferiblemente, estas mutaciones se incorporan al PIV químérico humano-bovino de la invención mediante una sustitución de aminoácidos idéntica, o conservadora, como la identificada en el mutante biológico. Así, los PIV recombinantes pueden incorporar una mutación en la que Tyr₉₄₂ está reemplazado por His, Leu₉₉₂ está reemplazado por Phe, y/o Thr₁₅₅₈ está reemplazado por Ile. Las sustituciones que son conservadoras para estos aminoácidos de reemplazamiento son útiles también para conseguir un fenotipo mutante deseado.

Otros ejemplos de mutaciones adoptadas a partir de un PIV mutante de origen biológico incluyen una o más mutaciones en la proteína N, incluyendo mutaciones específicas en una posición correspondiente a los residuos Val₉₆ o Ser₃₈₉ de JS cp45. En aspectos más detallados, estas mutaciones están representadas como sustituciones de Val₉₆ para Ala o Ser₃₈₉ para Ala o aquellas que son conservadoras para las mismas. Son útiles también dentro del PIV recombinante de la invención la sustitución de aminoácidos en la proteína C, por ejemplo, una mutación en una posición correspondiente a Ile₉₆ de JS cp45, preferiblemente representada por una sustitución idéntica o conservadora de Ile₉₆ para Thr. Otros ejemplos más de mutaciones adoptadas a partir de PIV mutantes de origen biológico, incluyen una mutación en el gen M tal como Pro₁₉₉ en JS cp45, o más mutaciones en la proteína F, incluyendo las mutaciones adoptadas a partir JS cp45 en una posición correspondiente a los residuos Ile₄₂₀ o Ala₄₅₀ de JS cp45, preferiblemente representadas por sustituciones ácidas Ile₄₂₀ para Val o Ala₄₅₀ para Thr o sustituciones conservadoras de las mismas. Otros PIV químéricos humano-bovinos dentro de la invención adoptan una o más sustituciones de aminoácidos en la proteína HN, como se ilustra aquí más adelante mediante un PIV recombinante que adopta una mutación en una posición correspondiente al residuo Val₃₈₄ de JS, preferiblemente representada por la sustitución de Val₃₈₄ para Ala.

Otros ejemplos adicionales dentro de este aspecto de la invención incluyen los PIV químéricos humano-bovinos que incorporan una o más mutaciones en porciones no codificadoras del genoma o antigenoma de PIV, por ejemplo en una secuencia líder 3'. Las mutaciones tomadas como ejemplo en este contexto pueden ser preparadas en una posición en el líder 3' de un virus recombinante en una posición correspondiente a los nucleótidos 23, 24, 28, o 45 de JS cp45. Otros ejemplos de mutaciones adicionales pueden ser preparados en la secuencia de partida del gen N, por ejemplo cambiando uno o más nucleótidos de la secuencia de partida del gen N, por ejemplo, en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS cp45. En aspectos más detallados los PIV químéricos humano-bovinos incorporan un cambio de T a C en el nucleótido 23, un cambio de C a T en el nucleótido 24, un cambio de G a T en el nucleótido 28, y/o un cambio de T a A en el nucleótido 45. Mutaciones adicionales en secuencias extrágénicas se ilustran por un cambio de A a T en la secuencia de partida del gen N en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS.

Estas mutaciones de los ejemplos mencionadas que se pueden preparar por ingeniería genética en un PIV químérico humano-bovino de la invención, han sido preparadas satisfactoriamente y recuperadas en PIV recombinante, como se representa por los clones recombinantes de PIV denominados rcp45, rcp45 L, rcp45 F, rcp45 M, rcp45 HN, rcp45 C, rcp45 F, rcp45 3'N, 3'NL, y rcp45 3'NCMFHN (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*; Skiadopolos *et al.*, 1998, *cita anterior*; Skiadopolos *et al.*, J. Virol. 73: 1374-1381, 1999b; solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/083.793, presentada el 22 de mayo de 1998; solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/047.575, presentada el 23 de mayo de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/53078), y solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/059.385, presentada el 19 de septiembre de 1997). Además, las referencias mencionadas antes describen la construcción de PIV recombinantes químéricos, por ejemplo, que tienen los genes HN y F de HPIV1 sustituidos en un genoma o antigenoma de fondo de HPIV3 parcial, que se modifican después para llevar una o más de las mutaciones atenuantes identificadas en HPIV3 JS cp45. Uno de tales recombinantes químéricos incorpora todas las mutaciones atenuantes identificadas en el gen L de cp45. Se ha demostrado por tanto que todas las mutaciones de cp45 fuera de los genes HN y F heterólogos (HPIV1) se pueden incorporar a un HPIV3-1 recombinante para dar un candidato para la vacuna químérica, atenuado.

A partir de JS cp45 y otros mutantes de PIV de origen biológico, se proporciona un amplio “menú” de mutaciones atenuantes, cada una de las cuales se puede combinar con cualquier otra mutación o mutaciones para ajustar el nivel de atenuación, la inmunogenicidad y la estabilidad genética en un PIV recombinante que lleva una mutación o mutaciones de delección o eliminación de C, D, y/o V. En este contexto, muchos PIVs recombinantes de la invención incluirán una 5 o más, y preferiblemente dos o más, mutaciones de PIV mutantes de origen biológico, por ejemplo, una cualquiera de las mutaciones identificadas en JS cp45 o una combinación de ellas. Los PIVs recombinantes preferidos dentro de la invención incorporarán una pluralidad y hasta un complemento completo de las mutaciones presentes en JS cp45 u otras cepas mutantes de PIV de origen biológico. Preferiblemente, estas mutaciones se estabilizan frente a la reversión 10 del PIV químérico humano-bovino mediante múltiples sustituciones de nucleótidos en un codón que especifica cada mutación.

Las mutaciones adicionales que se pueden incorporar en el PIV químérico humano-bovino de la invención son mutaciones, por ejemplo, mutaciones atenuantes, identificadas en PIV heterólogos o en virus con RNA de cadena negativa, no segmentados, más lejanamente relacionados. En particular, las mutaciones atenuantes y otras mutaciones 15 deseadas identificadas en un virus con RNA de cadena negativa pueden ser “transferidas”, por ejemplo, introducidas por mutagénesis en una posición correspondiente dentro del genoma o antigenoma del PIV químérico humano-bovino. En resumen, las mutaciones deseadas en un virus heterólogo con RNA de cadena negativa son transferidas al PIV receptor. Esto implica la localización de la mutación en el virus heterólogo, identificando de este modo por alineamiento 20 de la secuencia el correspondiente sitio en el RSV receptor, y mutando la secuencia nativa del PIV receptor al genotipo mutante (ya sea por una mutación idéntica o conservadora), como se describe en PCT/US00/09695 presentada el 12 de abril de 2000 y su prioridad solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/129.006, presentada el 13 de abril de 1999). Como demuestra esta descripción, es preferible modificar el genoma o antigenoma receptor para codificar una alteración en el sitio sometido a mutación, que corresponde de forma conservadora a la alteración identificada en el virus mutante heterólogo. Por ejemplo, si una sustitución de aminoácidos marca un sitio 25 de mutación en el virus mutante en comparación con la correspondiente secuencia natural, entonces se debe preparar por ingeniería genética una sustitución similar en el residuo o residuos correspondientes del virus recombinante. Preferiblemente la sustitución incluirá un aminoácido idéntico o conservador para el residuo sustituto presente en la proteína viral mutante. Sin embargo, es posible también alterar el residuo aminoácido nativo en el sitio de la mutación 30 de forma no conservadora con respecto al residuo sustituto en la proteína mutante (por ejemplo, utilizando cualquier otro aminoácido para romper o deteriorar la función del residuo natural).

Los virus con RNA de cadena negativa a partir de los cuales las mutaciones que se toman como ejemplo, se identifican y se transfieren al PIV químérico humano-bovino de la invención incluyen otros PIVs (por ejemplo, HPIV1, HPIV2, HPIV3, HPIV4A, HPIV4B y BPIV3), RSV, virus Sendai (SeV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), 35 virus 5 del simio (SV5), virus del sarampión (MeV), virus rinderpest, virus del distemper canino (CDV), virus de la rabia (RaV) y virus de la estomatitis vesicular (VSV), entre otros.

Una variedad de ejemplos de mutaciones para uso dentro de la invención están descritos en las referencias mencionadas antes, incluyendo pero sin limitarse a ella, una sustitución de aminoácidos de fenilalanina en la posición 521 40 de la proteína L de RSV que corresponde y por tanto es transferible a una sustitución de fenilalanina (o un aminoácido relacionado de forma conservadora) en la posición 456 de la proteína L de HPIV3. En el caso de mutaciones marcadas por delecciones o inserciones, éstas se pueden introducir como las correspondientes delecciones o inserciones en el virus recombinante, ya sea dentro del genoma o antigenoma de fondo o dentro del gen o segmento genómico heterólogo 45 incorporado al mismo. Sin embargo el tamaño particular y la secuencia de aminoácidos del fragmento de proteína deletreado o insertado puede variar.

Otros candidatos adicionales de vacuna de PIV humano-bovino dentro de la invención se pueden conseguir modificando el genoma o antigenoma del PIV químérico para codificar una mutación análoga a una mutación atenuante identificada en el virus Sendai (SeV). En un ejemplo, la mutación atenuante comprende una sustitución de aminoácidos de fenilalanina en la posición 170 de la proteína C de SeV. El genoma o antigenoma de PIV se modifica para codificar una alteración de un residuo conservado que corresponde de forma conservadora a la alteración que marca la mutación atenuante en el mutante SeV heterólogo. En una realización, la mutación se incorpora dentro de una proteína de HPIV3 recombinante y comprende una sustitución de aminoácidos de fenilalanina en la posición 164 de la proteína C de HPIV3.

Diferentes proteínas objetivos son responsables de la introducción de mutaciones atenuantes a partir de un virus 55 con RNA de cadena negativa en un sitio correspondiente dentro del PIV químérico humano-bovino de la invención. En todo el orden de los Mononegavirales, cinco proteínas objetivos están estrictamente conservadas y presentan grados de identidad de secuencia de moderados a altos, para regiones o dominios específicos. En particular, todos los miembros 60 conocidos del orden, comparten una constelación homóloga de cinco proteínas: una proteína (N) de la nucleocápsida, una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, una proteína (M) de la matriz no glucosilada, al menos una glucoproteína (HN, F, H, o G) de superficie y una proteína (L) polimerasa de gran dimensión. Estas proteínas representan todas objetivos útiles para incorporar mutaciones atenuantes mediante la alteración de uno o más residuos conservados en una proteína del virus recombinante en un sitio que corresponde al sitio de una mutación atenuante identificado en el virus mutante heterólogo.

En este contexto, los métodos para transferir mutaciones heterólogas al PIV químérico humano-bovino de la invención se basan en la identificación de una mutación atenuante en un primer virus con RNA de cadena negativa.

La mutación, identificada en términos de secuencia mutante frente a secuencia natural en la posición del aminoácido sujeto que marca el sitio de la mutación, proporciona un índice para comparación de la secuencia frente a una proteína homóloga en el virus químérico (ya sea en el genoma o antigenoma de fondo o en el gen o segmento génico heterólogo añadido o sustituido en el mismo) que es el objetivo para la atenuación recombinante. La mutación atenuante puede ser

5 conocida previamente o puede ser identificada por técnicas mutagénicas y técnicas de genética reversa aplicadas para generar y caracterizar el virus mutante de origen biológico. Alternativamente, las mutaciones atenuantes de interés se pueden generar y caracterizar *de novo*, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio y métodos convencionales de cribado.

10 Cada mutación atenuante identificada en un virus con RNA de cadena negativa proporciona un índice para la comparación de secuencias frente a una proteína homóloga en uno o más virus heterólogos de cadena negativa. En este contexto, se pueden analizar los alineamientos existentes de las secuencias, o se pueden emplear métodos convencionales de alineamiento de las secuencias para producir comparaciones de secuencias para análisis, para identificar las 15 regiones proteínicas y las posiciones de aminoácidos correspondientes entre la proteína que lleva la mutación atenuante y una proteína homóloga de un virus diferente que es el virus recombinante objetivo para la atenuación. Cuando uno o más residuos que marcan la mutación atenuante han sido alterados a partir de una identidad “natural” que se conserva en la posición del aminoácido correspondiente en la proteína del virus químérico humano-bovino objetivo, el genoma o antigenoma del virus objetivo se modifica recombinantemente para codificar una delección, sustitución, o inserción de aminoácidos para alterar el residuo o residuos conservados en la proteína del virus objetivo y con ello 20 conferir un fenotipo análogo, atenuado en el virus recombinante.

Dentro de este método de diseño racional para construir virus recombinantes atenuados de cadena negativa, la identidad natural del residuo o residuos en las posiciones de aminoácidos que marcan una mutación atenuante en un virus con RNA de cadena negativa, puede ser conservada estrictamente, o mediante sustitución conservadora en 25 las correspondientes posiciones de aminoácidos en la proteína del virus químérico humano-bovino objetivo. Así, el residuo o residuos correspondientes en la proteína del virus objetivo pueden ser idénticos, o pueden estar relacionados de forma conservadora en términos de estructura y función del grupo lateral de aminoácidos, con el residuo o residuos naturales que son alterados por la mutación atenuante en el virus mutante heterólogo. En cualquier caso, se puede conseguir una atenuación análoga en el virus recombinante según los métodos de la invención modificando el genoma 30 o antigenoma recombinante del virus objetivo para codificar la delección, sustitución, o inserción de aminoácidos para alterar el residuo o residuos conservados.

En este contexto, es preferible modificar el genoma o antigenoma para codificar una alteración del residuo o residuos conservados que corresponde de forma conservadora a la alteración que marca la mutación atenuante en el virus 35 mutante heterólogo. Por ejemplo, si una sustitución de aminoácidos marca un sitio de mutación en el virus mutante en comparación con la correspondiente secuencia natural, entonces debe ser preparada una sustitución en el residuo o residuos correspondientes del virus recombinante. Preferiblemente la sustitución será idéntica o conservadora para el residuo sustituto presente en la proteína viral mutante. Sin embargo, es posible alterar también el residuo de aminoácido nativo en el sitio de mutación de forma no conservadora con respecto al residuo sustituto en la proteína mutante 40 (por ejemplo, utilizando cualquier otro aminoácido para romper o deteriorar la identidad y función del residuo natural). En el caso de mutaciones marcadas por delecciones o inserciones, estas pueden ser transferidas como delecciones o inserciones correspondientes al virus recombinante, sin embargo el tamaño particular y la secuencia de aminoácidos del fragmento de proteína delecionado o insertado puede variar.

45 Dentro de aspectos alternativos de la invención, las mutaciones así transferidas desde los virus mutantes heterólogos de cadena negativa pueden conferir una variedad de fenotipos dentro del PIV químérico humano-bovino de la invención, en adición o asociación con el fenotipo atenuado deseado. Así, las mutaciones tomadas como ejemplo incorporadas dentro de las proteínas recombinantes del virus, pueden conferir fenotipos sensibles a la temperatura (ts), adaptados al frío (ca), de placas pequeñas (sp), o con rango de hospedadores restringido (hr), o un cambio en el crecimiento o en la inmunogenicidad, en adición al fenotipo atenuado o asociados con él.

50 Las mutaciones atenuantes en los PIV de origen biológico y otros virus no segmentados con RNA de cadena negativa para incorporación dentro del PIV químérico humano-bovino, pueden tener lugar naturalmente o pueden ser introducidas en las cepas de PIV naturales por procedimientos de mutagénesis bien conocidos. Por ejemplo, se pueden producir cepas parentales de PIV incompletamente atenuadas por mutagénesis química durante el crecimiento del virus en cultivos celulares a los cuales se ha añadido un mutágeno químico, mediante selección de un virus que ha sido sometido a pases a temperaturas subóptimas con el fin de introducir mutaciones de restricción del crecimiento, o mediante selección de un virus mutagenizado que produce placas pequeñas (sp) en cultivo celular, como se describe en las referencias mencionadas antes.

60 Por “PIV de origen biológico” se entiende cualquier PIV no producido por medios recombinantes. Por tanto, los PIV de origen biológico incluyen todos los PIV naturales, incluyendo, por ejemplo, los PIV naturales que tienen una secuencia genómica natural y los PIV que tienen variaciones genómicas alélicas o mutantes a partir de una secuencia de referencia de RSV natural, por ejemplo, los PIV que tienen una mutación que especifica un fenotipo atenuado. 65 Asimismo, los PIV de origen biológico incluyen PIV mutantes derivados de un PIV parental, por procedimientos artificiales de mutagénesis y selección, entre otros.

ES 2 312 347 T3

Como se ha indicado antes, la producción de un mutante de PIV de origen biológico suficientemente atenuado, se puede conseguir por varios métodos conocidos. Uno de tales procedimientos implica someter un virus parcialmente atenuado a pases en cultivo celular a temperaturas atenuantes progresivamente más bajas. Por ejemplo, se producen mutantes parcialmente atenuados mediante pases en cultivos celulares a temperaturas subóptimas. Así, un mutante cp

5 (pasado por frío) u otra cepa de PIV parcialmente atenuada se adapta a un crecimiento eficiente en una temperatura más baja mediante pases en cultivo. Esta selección de un PIV mutante durante pases en frío reduce sustancialmente cualquier virulencia residual en las cepas derivadas en comparación con el virus parental parcialmente atenuado.

Alternativamente, se pueden introducir mutaciones específicas en los PIV de origen biológico sometiendo un virus 10 parental parcialmente atenuado a mutagénesis química, por ejemplo, para introducir mutaciones ts (sensibles a la temperatura) o, en el caso de virus que ya son ts, mutaciones ts adicionales suficientes para conferir un aumento de la atenuación y/o estabilidad del fenotipo ts del derivado atenuado. Los medios para la introducción de mutaciones ts en 15 el PIV incluyen la replicación del virus en presencia de un mutágeno tal como 5-fluorouridina según procedimientos generalmente conocidos. Se pueden usar también otros mutágenos químicos. La atenuación puede resultar de una mutación ts en casi todos los genes de PIV, aunque se ha encontrado que es un objetivo particularmente dispuesto para este propósito, el gen (L) de la polimerasa.

El nivel de sensibilidad a la temperatura de la replicación en PIV atenuados tomados como ejemplo, para uso 20 dentro de la invención se determina comparando su replicación a una temperatura permisiva con la replicación a varias temperaturas restrictivas. La temperatura más baja en la que la replicación del virus se reduce 100 veces o más en comparación con su replicación a la temperatura permisiva se denomina temperatura de desconexión. En los animales experimentales y en los seres humanos, tanto la replicación como la virulencia de PIV están correlacionadas con la temperatura de desconexión del mutante.

25 Se ha encontrado que el mutante JS cp45 HPIV3 es relativamente estable genéticamente, altamente inmunógeno, y satisfactoriamente atenuado. El análisis de la secuencia de nucleótidos de este virus de origen biológico y los virus recombinantes que incorporan diferentes mutaciones individuales y combinadas encontradas en ellos, indica que cada nivel de aumento de la atenuación está asociado con sustituciones específicas de nucleótidos y aminoácidos. Las referencias mencionadas antes describen también cómo distinguir de manera rutinaria entre las mutaciones incidentales 30 silentes y aquellas que son responsables de las diferencias de fenotipo, mediante la introducción de las mutaciones, por separado y en diferentes combinaciones, en el genoma o antigenoma de clones de PIV infeccioso. Este procedimiento acoplado con la evaluación de las características fenotípicas del virus parental y del virus derivado identifica las mutaciones responsables de características deseadas tales como la atenuación, la sensibilidad a la temperatura, la adaptación al frío, el tamaño de placas pequeñas, la restricción del rango de hospedadores, etc.

35 Las mutaciones identificadas de este modo se compilan en un "menú" y se introducen entonces como se deseé, solas o en combinación, para ajustar un PIV químérico humano-bovino hasta un nivel apropiado de atenuación, inmunogenicidad, resistencia genética a la reversión desde un fenotipo atenuado, etc., tal como se deseé. De acuerdo con la descripción anterior, la capacidad para producir PIV infecciosos a partir del cDNA permite la introducción de 40 cambios específicos producidos por ingeniería genética dentro del PIV químérico humano-bovino. En particular, los PIV recombinantes infecciosos se emplean para la identificación de mutaciones específicas en cepas atenuadas de PIV, de origen biológico, por ejemplo mutaciones que especifican los fenotipos ts, ca, att y otros fenotipos. Las mutaciones deseadas se identifican de este modo y se introducen en las cepas de vacuna de PIV químérico humano-bovino recombinante. La capacidad de producir virus a partir del cDNA permite la incorporación rutinaria de estas mutaciones, 45 individualmente o en diferentes combinaciones seleccionadas, a un clon de cDNA de longitud completa, y después se pueden determinar fácilmente los fenotipos de los virus recombinantes rescatados que contienen las mutaciones introducidas.

Identificando e incorporando mutaciones específicas, de origen biológico, asociadas con los fenotipos deseados, 50 por ejemplo, un fenotipo cp o ts, en los clones de PIV infecciosos, la invención proporciona otras modificaciones específicas del sitio en la mutación identificada o en la proximidad de ella. Mientras que la mayor parte de las mutaciones atenuantes producidas en los PIV de origen biológico son cambios de un único nucleótido, también se pueden incorporar otras mutaciones "específicas del sitio" mediante técnicas recombinantes en el PIV de origen biológico o recombinante. Como se usa aquí, las mutaciones específicas del sitio incluyen inserciones, sustituciones, delecciones 55 o reordenamientos desde 1 a 3, hasta aproximadamente 5-15 o más nucleótidos alterados (por ejemplo, alterados a partir de una secuencia de PIV natural, a partir de una secuencia de una cepa seleccionada de PIV mutante, o a partir de un clon de PIV recombinante parental sometido a mutagénesis). Dichas mutaciones específicas del sitio pueden ser incorporadas en o dentro de la región de una mutación puntual de origen biológico, seleccionada. Alternativamente, se 60 pueden introducir las mutaciones en otros contextos diferentes dentro de un clon de PIV, por ejemplo en una secuencia reguladora que actúa en *cis* o secuencia de nucleótidos, o cerca de ella, que codifica un sitio activo de la proteína, sitio de unión, epítopo inmunógeno, etc. Los mutantes de PIV específicos del sitio retienen típicamente un fenotipo de atenuación deseado, pero pueden presentar adicionalmente características fenotípicas alteradas no relacionadas con la atenuación, por ejemplo, inmunogenicidad mejorada o ampliada, y/o mejora del crecimiento. Otros ejemplos de mutantes deseados, específicos del sitio incluyen PIV recombinante diseñado para incorporar mutaciones adicionales de 65 nucleótidos estabilizantes en un codón que especifica una mutación puntual atenuante. Cuando sea posible, se introducen dos o más sustituciones de nucleótidos en los codones que especifican cambios de aminoácidos atenuantes en un clon de PIV parental mutante o recombinante, dando un PIV de origen biológico o recombinante que tiene resistencia genética a la reversión, a partir de un fenotipo atenuado. En otras realizaciones, las sustituciones, adiciones, delecciones

o reordenamientos de nucleótidos específicas del sitio, se introducen hacia arriba o hacia abajo, por ejemplo, desde 1 a 3, de 5-10 y hasta 15 nucleótidos o más en 5' o 3', en relación con una posición de nucleótido objetivo, por ejemplo, para construir o eliminar un elemento regulador existente que actúa en *cis*.

- 5 En adición a las mutaciones puntuales simples y múltiples y las mutaciones específicas del sitio, los cambios en el PIV químérico humano-bovino descritos aquí, incluyen delecciones, inserciones, sustituciones o reordenamientos de uno o más genes o segmentos genómicos. Son particularmente útiles las delecciones que incluyen uno o más genes o segmentos genómicos, cuyas delecciones han demostrado producir efectos fenotípicos adicionales deseados para ajustar las características del PIV químérico humano-bovino dentro de la invención. Así, la solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/350.821, presentada por Durbin *et al.* el 9 de julio de 1999, describe métodos y composiciones en los que la expresión de uno o más genes de HPIV, ilustrada por los ORF de C, D, y/o V, es reducida o eliminada modificando el genoma o antigenoma de PIV para incorporar una mutación que altera la asignación codificadora de un codón de iniciación o mutaciones que introducen uno o uno o más codones de terminación. Alternativamente, uno o más de los ORF de C, D, y/o V pueden ser delecionados en todo o en parte para hacer que las correspondientes proteínas sean parcial o totalmente no funcionales o para romper totalmente la expresión de la proteína. El PIV recombinante que tiene tales mutaciones en C, D, y/o V, u otros genes no esenciales, tiene características fenotípicas altamente deseables para el desarrollo de la vacuna. Por ejemplo, estas modificaciones pueden especificar uno o más cambios fenotípicos deseados incluyendo (i) propiedades alteradas del crecimiento en cultivo celular, (ii) atenuación en el tracto respiratorio superior y/o inferior de los mamíferos, (iii) un cambio en el tamaño de la placa viral, (iv) un cambio en el efecto citopático, y (v) un cambio en la inmunogenicidad. Uno de tales mutantes ejemplares "inactivados" "(knock out)" que carece de la expresión del ORF de C, designado rC-KO, fue capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora frente al enfrentamiento con HPIV3 natural en un modelo de primate no humano a pesar de su fenotipo de atenuación beneficioso.
- 10 25 Por tanto, en aspectos más detallados de la presente invención, el PIV químérico humano-bovino incorpora mutaciones por delección o inactivación en los ORF de C, D, y/o V que alteran o eliminan la expresión de los genes o segmentos genómicos seleccionados. Esto se puede conseguir, por ejemplo, introduciendo una mutación de desplazamiento del marco o un codón de terminación dentro de una secuencia codificadora seleccionada, alterando los sitios de iniciación de la traducción, cambiando la posición de un gen o introduciendo un codón de iniciación hacia arriba para alterar su velocidad de expresión, cambiando las señales de transcripción GS y/o GE para alterar el fenotipo, o modificando un sitio de edición del RNA (por ejemplo, restricciones de crecimiento, restricciones de temperatura en la transcripción, etc.). En aspectos más detallados de la invención, se proporcionan PIV químéricos humano-bovinos en los que la expresión de uno o más genes, por ejemplo, los ORF de C, D, y/o V, es eliminada a nivel de traducción o de transcripción sin delección del gen o de uno de sus segmentos, por ejemplo, introduciendo múltiples codones de terminación de la traducción en un marco de lectura abierto (ORF) de la traducción, alterando un codón de iniciación, o modificando un sitio de edición. Estas formas de virus inactivados presentarán a menudo tasas reducidas de crecimiento y tamaños pequeños de placas en el cultivo de tejidos. Por tanto aún así, estos métodos proporcionan nuevos tipos adicionales de mutaciones atenuantes que eliminan la expresión de un gen viral que no es uno de los antígenos virales protectores mayores. En este contexto, los fenotipos del virus inactivado producido sin delección de un gen o segmento genómico pueden ser producidos alternativamente mediante mutagénesis por delección, como se ha descrito, para excluir de modo efectivo las mutaciones correctoras que pueden restaurar la síntesis de una proteína objetivo. Se pueden preparar otras diversas inactivaciones de genes para la delección de los ORF de C, D, y/o V, y mutantes inactivos, utilizando diseños y métodos alternativos que son bien conocidos en la técnica (como se describe, por ejemplo, en Kretschmer *et al.*, Virology 216: 309-316, 1996; Radecke *et al.*, Virology 217: 418-421, 1996; y Kato *et al.*, 1987a, *cita anterior*; y Schneider *et al.*, 1997, *cita anterior*).
- 15 20 25 30 35 40 45

Estas y otras modificaciones de nucleótidos en el PIV químérico humano-bovino pueden alterar algunas bases (por ejemplo, de 15-30 bases, hasta 35-50 bases o más), grandes bloques de nucleótidos (por ejemplo, 50-100, 100-300, 300-500, 500-1.000 bases), o genes casi completos o completos (por ejemplo, 1.000-1.500 nucleótidos, 1.500-2.500 nucleótidos, 2.500-5.000, nucleótidos, 5.000-6.500 nucleótidos o más) en el genoma o antigenoma del donante o del receptor, dependiendo de la naturaleza del cambio (esto es, se pueden cambiar unas pocas bases para insertar o eliminar un epítopo inmunógeno o cambiar un pequeño segmento genómico, mientras que, están implicados grandes bloques de bases cuando se añaden, sustituyen, delecionan o reordenan genes o segmentos genómicos grandes).

- 55 55 En aspectos relacionados, la invención proporciona la suplementación de mutaciones adoptadas en un clon de PIV recombinante procedente de un PIV de origen biológico, por ejemplo, mutaciones cp y ts, con tipos adicionales de mutaciones que incluyen los mismos o diferentes genes en un clon adicional de PIV modificado. Cada uno de los genes de PIV pueden ser alterados selectivamente en términos de niveles de expresión, o pueden ser añadidos, delecionados, sustituidos, o reordenados, en todo o en parte, solos o en combinación con otras modificaciones deseadas, para dar un PIV químérico humano-bovino que presenta nuevas características de vacuna. Así, en adición o en combinación con mutaciones atenuantes adoptadas de los mutantes de PIV de origen biológico, la presente invención proporciona también una serie de métodos adicionales para atenuar o modificar de otro modo el fenotipo del PIV químérico humano-bovino, basados en preparar por ingeniería recombinante clones de PIV infecciosos. Se puede producir una variedad de alteraciones en una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un gen o segmento genómico objetivo, incluyendo un gen o segmento genómico del donante o del receptor en un genoma o antigenoma del PIV químérico para incorporación en los clones infecciosos. Más específicamente, para conseguir los cambios estructurales y fenotípicos deseados en el PIV recombinante, la invención permite la introducción de modificaciones que delecionan, sustituyen, introducen, o reordenan un nucleótido o una pluralidad de nucleótidos seleccionados de un genoma o antigenoma

parental, así como mutaciones que delecianan, sustituyen, introducen, o reordenan genes enteros o segmentos genómicos, dentro de un clon de PIV químérico humano-bovino.

Se proporcionan así modificaciones en el PIV químérico humano-bovino que simplemente alteran o eliminan la expresión de un gen seleccionado, por ejemplo, introduciendo un codón de terminación dentro de una secuencia codificadora de PIV seleccionada o alterando su sitio de iniciación de la traducción o sitio de edición de RNA, cambiando la posición de un gen de PIV en relación con un promotor funcionalmente ligado, introduciendo un codón de iniciación hacia arriba para alterar las velocidades de expresión, modificando (por ejemplo, cambiando la posición, alterando una secuencia existente, o sustituyendo una secuencia existente con una secuencia heteróloga) las señales de transcripción GS y/o GE para alterar el fenotipo (por ejemplo, restricciones de crecimiento, restricciones de temperatura en la transcripción, etc.), y otras diferentes deleciones, sustituciones, adiciones y reordenamientos que especifican cambios cuantitativos o cualitativos en la replicación viral, transcripción de genes seleccionados, o traducción de los RNA seleccionados. En este contexto, cualquier gen o segmento genómico de PIV que no es esencial para el crecimiento puede ser eliminado o modificado de otro modo en un PIV recombinante para dar los efectos deseados sobre la virulencia, patogénesis, inmunogenicidad y otros caracteres fenotípicos. Lo mismo que para las secuencias codificadoras, las regiones no codificadoras, líderes, tráiler e intergénicas pueden ser delecianadas, sustituidas o modificadas similarmente y sus efectos fenotípicos analizados fácilmente, por ejemplo, mediante el uso de minirreplicones y PIV recombinante.

Además, se puede producir una variedad de otras alteraciones genéticas en un genoma o antigenoma de PIV para la incorporación en el PIV químérico humano-bovino, solas o junto con una o más mutaciones atenuantes adoptadas a partir de un PIV mutante de origen biológico, por ejemplo, para ajustar el crecimiento, atenuación, inmunogenicidad, estabilidad genética o proporcionar otras ventajas estructurales y/o efectos fenotípicos. Estos tipos de mutaciones adicionales están descritos también en las referencias mencionadas antes y pueden ser fácilmente producidas por ingeniería genética en el PIV químérico humano-bovino de la invención.

Además de estos cambios, el orden de los genes en un PIV químérico humano-bovino puede ser cambiado, un genoma promotor de PIV puede ser reemplazado con su antigenoma homólogo, porciones de genes pueden ser eliminadas o sustituidas, e incluso genes enteros pueden ser delecianados. Se pueden hacer modificaciones diferentes o adicionales en la secuencia para facilitar las manipulaciones, tales como la inserción de sitios únicos de restricción en diferentes regiones intergénicas o en otro sitio. Las secuencias del gen no traducidas se pueden separar para aumentar la capacidad para insertar secuencias extrañas.

Otras mutaciones para incorporación en el PIV químérico humano-bovino de la invención incluyen las mutaciones dirigidas hacia señales que actúan en *cis*, que pueden ser identificadas, por ejemplo, por análisis mutacional de minigenomas de PIV. Por ejemplo, el análisis de inserción y deleción de las secuencias líder y tráiler y de las secuencias flanqueantes identifica los promotores virales y las señales de transcripción y proporciona una serie de mutaciones asociadas con grados variables de reducción de la replicación o transcripción del RNA. La mutagénesis por saturación (con lo que cada posición es a su vez modificada para cada uno de los nucleótidos alternativos) de estas señales que actúan en *cis* también ha identificado muchas mutaciones que afectan a la replicación o transcripción del RNA. Cualquiera de estas mutaciones se puede insertar en un antigenoma o genoma de PIV químérico humano-bovino como se describe aquí. La evaluación y manipulación de las proteínas que actúan en *trans* y las secuencias de RNA que actúan en *cis* utilizando el cDNA de antigenoma completo es ayudada por el uso de minigenomas de PIV como se describe en la referencia mencionada antes.

Mutaciones adicionales dentro del PIV químérico humano-bovino incluyen el reemplazo del extremo 3' de genoma con su homólogo del antigenoma que se asocia con cambios en la replicación y transcripción de RNA. En una realización tomada como ejemplo, el nivel de expresión de proteínas específicas de PIV, tales como los antígenos protectores HN y/o F, se puede aumentar sustituyendo las secuencias naturales con unas que se han preparado sintéticamente y se han diseñado para ser consistentes con una traducción eficiente. En este contexto, se ha demostrado que el uso del codón puede ser un factor importante en el nivel de traducción de las proteínas virales de mamífero (Hans *et al.*, Current Biol. 6: 315-324, 1996). La optimización mediante métodos recombinantes del uso del codón de los mRNA que codifican las proteínas HN y F de PIV, que son los antígenos protectores mayores, proporcionará una mejor expresión de estos genes.

En otra realización ejemplar, una secuencia que rodea un sitio de iniciación de la traducción (preferiblemente que incluye un nucleótido en la posición 3) de un gen seleccionado de PIV, es modificada, sola o en combinación con la introducción de un codón de iniciación hacia arriba, para modular la expresión del gen de PIV especificando la regulación por incremento o la regulación por reducción de la traducción (Kozak *et al.*, J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987). Alternativamente, o en combinación con otras modificaciones de PIV descritas aquí, la expresión génica de un PIV químérico humano-bovino puede ser modulada alterando una señal de transcripción GS o GE de cualquier gen o genes seleccionados del virus. En realizaciones alternativas, los niveles de expresión del gen en el PIV químérico humano-bovino se modifican en el nivel de transcripción. En un aspecto, la posición de un gen seleccionado en el mapa de genes de PIV puede ser cambiada a una posición más próxima al promotor o más distante del promotor, con lo que el gen se expresará, respectivamente con más o menos eficiencia. Según este aspecto, la modulación de la expresión para genes específicos se puede conseguir produciendo reducciones o aumentos de la expresión del gen desde dos veces, más típicamente cuatro veces, hasta diez veces o más en comparación con los niveles naturales a menudo asistidos por una reducción acorde en los niveles de expresión para los genes sustituidos recíprocamente, posicionalmente. Estos

ES 2 312 347 T3

y otros cambios de transposición producen nuevos PIV quiméricos humano-bovinos que tienen fenotipos atenuados, por ejemplo debidos a una reducción de la expresión de proteínas virales seleccionadas implicadas en la replicación del RNA, o que tienen otras propiedades deseables tales como un aumento de la expresión del antígeno.

- 5 Los clones infecciosos de PIV quimérico humano-bovino de la invención también se pueden preparar por ingeniería genética según los métodos y composiciones descritos aquí para aumentar la inmunogenicidad e inducir un nivel de protección mayor que el proporcionado por la infección con un PIV natural o un PIV parental. Por ejemplo, se puede añadir un epítopo inmunógeno procedente de una cepa o tipo de PIV heterólogo, o procedente de una fuente no PIV tal como RSV, a un clon recombinante mediante cambios apropiados de nucleótidos en la secuencia de polinucleótidos
10 10 que codifica el genoma o antigenoma. Alternativamente, se puede preparar el PIV mutante de la invención para añadir o eliminar (por ejemplo, mediante inserción, sustitución o delección de aminoácidos) proteínas inmunógenas, dominios de proteínas, o formas de proteínas específicas asociadas con reacciones inmunológicas deseables o indeseables.

Dentro de los métodos de la invención, se pueden insertar genes o segmentos genómicos adicionales en el genoma
15 o antigenoma de PIV quimérico humano-bovino o próximos a él. Estos genes pueden estar bajo un control común con los genes receptores, o pueden estar bajo el control de un conjunto independiente de señales de transcripción. Los genes de interés incluyen los genes de PIV identificados antes, así como los genes no PIV. Los genes no PIV de interés incluyen aquellos que codifican citocinas (por ejemplo, de IL-2 a IL-18, especialmente IL-2, IL-6 y IL-12, IL-18, etc.). gamma-interferón, y proteínas ricas en epítopos de células ayudadoras T. Estas proteínas adicionales se
20 20 pueden expresar como una proteína separada, o como una copia supernumeraria de las proteínas de PIV existentes, tales como HN o F. Esto proporciona la capacidad de modificar y mejorar las respuestas inmunitarias frente a PIV tanto cuantitativamente como cualitativamente.

Las delecciones, inserciones, sustituciones y otras mutaciones que implican cambios de los genes virales enteros
25 25 o segmentos genómicos dentro de un PIV quimérico humano-bovino dan candidatos para la vacuna altamente estable, que son particularmente importantes en el caso de los individuos inmunodeprimidos. Muchos de estos cambios producirán una atenuación de las cepas de vacuna resultantes, mientras que otros especificarán diferentes tipos de cambios fenotípicos deseados. Por ejemplo, los genes accesorios (esto es, no esenciales para el crecimiento *in vitro*) son excelentes candidatos para codificar proteínas que interfieren específicamente con la inmunidad del hospedador
30 30 (véase, por ejemplo, Kato *et al.*, 1997a, *cita anterior*). Se espera que la eliminación de tales genes en los virus de la vacuna reduzca la virulencia y/o mejore la inmunogenicidad.

Se describen composiciones (por ejemplo, polinucleótidos aislados y vectores que incorporan el cDNA que codifica el PIV quimérico humano-bovino) para producir un PIV aislado infeccioso. Utilizando estas composiciones y métodos, se generan PIV infecciosos a partir de un genoma o antigenoma de PIV, una proteína (N) de la nucleocápsida, una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, y una proteína (L) polimerasa de gran dimensión. También se describen composiciones y métodos para introducir los cambios estructurales y fenotípicos mencionados en un PIV recombinante para dar virus de la vacuna infecciosos, atenuados.

40 La introducción de las mutaciones definidas antes en un clon infeccioso de PIV quimérico humano-bovino se puede conseguir por una variedad de métodos bien conocidos. Por "clon infeccioso" con respecto al DNA se entiende un cDNA o su producto, sintético o de otro modo, que puede ser transcrita a un RNA genómico o antigenómico capaz de servir como plantilla para producir el genoma de un virus o partícula subviral infecciosa. Así, se pueden introducir mutaciones definidas mediante técnicas convencionales (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio) en una copia
45 45 del cDNA del genoma o antigenoma. El uso de subfragmentos de cDNA del antigenoma o genoma para ensamblar un cDNA de antigenoma o genoma completo como se describe aquí tiene la ventaja de que cada región puede ser manipulada por separado (los cDNA pequeños son más fáciles de manipular que los grandes) y después pueden ser ensamblados más fácilmente en el cDNA completo. Así, el cDNA de antigenoma o genoma completo, o cualquier subfragmento del mismo se pueden usar como plantilla para la mutagénesis dirigida a los oligonucleótidos. Esto puede de hacerse por intermedio de una forma fágemida de cadena única, tal como utilizando el kit Muta-gene® de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) o un método que utiliza un plásmido de cadena doble directamente como plantilla tal como el kit de mutagénesis Chameleon de Stratagene (La Jolla, CA), o mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando un cebador oligonucleótido o una plantilla que contiene la mutación o mutaciones de interés. Después, un subfragmento mutado puede ser ensamblado en el cDNA del antigenoma o genoma completo. Se conoce una variedad
50 50 de otras técnicas de mutagénesis y están disponibles para uso en la producción de las mutaciones de interés en el cDNA del antigenoma o genoma de PIV. Las mutaciones pueden variar desde cambios de un único nucleótido hasta el reemplazamiento de grandes trozos de cDNA que contienen uno o más genes o regiones del genoma.

Así, en un ejemplo se introducen las mutaciones utilizando el kit de mutagénesis *in vitro* con un fágemido Muta-gene disponible de Bio-Rad. En resumen, el cDNA que codifica una porción de genoma o antigenoma de PIV es clonado en el plásmido pTZ18U, y utilizado para transformar las células CJ236 (Life Technologies). Las preparaciones del fágemido se preparan como recomienda el fabricante. Se diseñan oligonucleótidos para mutagénesis mediante la introducción de un nucleótido alterado en la posición deseada del genoma o antigenoma. El plásmido que contiene el fragmento de genoma o antigenoma alterado genéticamente se amplifica después y el trozo mutado se reintroduce
65 65 entonces en el clon del genoma o antigenoma de longitud completa.

Los PIV infecciosos de la invención se pueden producir por coexpresión intracelular o libre de células de una o más moléculas de polinucleótidos aisladas que codifican un RNA del genoma o antigenoma de PIV, junto con uno

o más polinucleótidos que codifican las proteínas virales necesarias para generar una nucleocápsida de transcripción, replicación. Entre las proteínas virales útiles para coexpresión para obtener PIV infecciosos están la proteína mayor de la nucleocápsida proteína (N), la fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, la proteína (L) polimerasa de gran dimensión, la proteína (F) de fusión, la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), y la proteína de la matriz (M). También 5 son útiles en este contexto los productos de los ORF de C, D y V de PIV.

Los cDNA que codifican un genoma o antigenoma de PIV se construyen para la coexpresión intracelular o *in vitro* con las necesarias proteínas virales para formar un PIV infeccioso. Por “antigenoma de PIV” se entiende una molécula aislada de polinucleótido de sentido positivo que sirve como plantilla para la síntesis del genoma progenie de PIV. 10 Preferiblemente se construye un cDNA que es una versión de sentido positivo del genoma de PIV correspondiente al RNA intermedio replicativo, o antigenoma, de manera que se minimice la posibilidad de hibridarse con transcritos de sentido positivo de secuencias complementarias que codifican proteínas necesarias para generar una nucleocápsida de transcripción, replicación.

15 En algunas realizaciones de la invención el genoma o antigenoma de un PIV recombinante (rPIV) sólo necesita contener aquellos genes o porciones de los mismos necesarios para convertir en infecciosas las partículas virales o subvirales codificadas por ellos. Además, los genes o sus porciones pueden ser proporcionados por más de una molécula de polinucleótido, esto es, un gen puede ser proporcionado por complementación o cosa similar, a partir 20 de una molécula separada de nucleótido. En otras realizaciones, el genoma o antigenoma de PIV codifica todas las funciones necesarias para el crecimiento, replicación, e infección viral sin la participación de un virus ayudador o una función viral proporcionada por un plásmido o línea de células ayudadoras.

Por “PIV recombinante” se entiende una partícula viral o subviral de PIV o tipo PIV derivada directa o indirectamente de un sistema de expresión recombinante o propagada a partir de virus o partículas subvirales producidas en él. 25 El sistema de expresión recombinante empleará un vector de expresión recombinante que comprende una unidad de transcripción ligada de forma funcional que comprende un ensamblaje de al menos un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica de PIV, por ejemplo, un promotor, una secuencia estructural o codificadora que es transcripta al RNA del PIV, y secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción.

30 Para producir un PIV infeccioso a partir de un genoma o antigenoma de PIV expresado en cDNA, el genoma o antigenoma es coexpresado con aquellas proteínas N, P y L de PIV necesarias para (i) producir una nucleocápsida capaz de replicación con RNA, y (ii) hacer competentes a las nucleocápsidas progenie para ambos RNA, el de replicación y el de transcripción. La transcripción mediante la nucleocápsida del genoma proporciona las otras proteínas de PIV 35 e inicia una infección productiva. Alternativamente, las proteínas de PIV adicionales necesarias para una infección productiva pueden ser aportadas por coexpresión.

La síntesis de antigenoma o genoma de PIV junto con las proteínas virales mencionadas antes, se puede conseguir también *in vitro* (libre de células), por ejemplo, utilizando una reacción combinada de transcripción-traducción, seguida por la transfección a las células. Alternativamente, el RNA de antigenoma o genoma se puede sintetizar *in vitro* y 40 transfectar a las células que expresan las proteínas de PIV.

Las secuencias complementarias que codifican las proteínas necesarias para generar una nucleocápsida de PIV de transcripción y replicación, son proporcionadas por uno o más virus ayudadores. Tales virus ayudadores pueden ser naturales o mutantes. Preferiblemente, el virus ayudador se puede distinguir fenotípicamente del virus codificado por 45 el cDNA de PIV. Por ejemplo, es deseable proporcionar anticuerpos monoclonales que reaccionan inmunológicamente con el virus ayudador pero no con el virus codificado por el cDNA de PIV. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos se pueden usar en cromatografía de afinidad para separar el virus ayudador del virus recombinante. Para ayudar a la obtención de tales anticuerpos, se pueden introducir mutaciones en el cDNA de PIV para proporcionar la diversidad antigenética del virus ayudador, tal como en los genes de las glucoproteínas HN o F.

50 Las proteínas N, P, L y otras proteínas deseadas de PIV pueden ser codificadas por uno o más vectores de expresión no virales, que pueden ser los mismos o separados del que codifica el genoma o antigenoma. Se pueden incluir si se desea proteínas adicionales, cada una de ellas codificada por su propio vector o por un vector que codifica una o más de las proteínas N, P, L y otras proteínas deseadas de PIV, o el genoma o antigenoma completo. La expresión 55 del genoma o antigenoma y de las proteínas a partir de los plásmidos transfectados, se puede conseguir por ejemplo, mediante cada cDNA que está bajo el control de un promotor para la T7 RNA polimerasa, que a su vez es suministrado por infección, transfección o transducción con un sistema de expresión para la T7 RNA polimerasa, por ejemplo, una cepa recombinante de virus vaccinia MVA que expresa la T7 RNA polimerasa (Wyatt *et al.*, *Virology*210: 202-205, 1995). Las proteínas virales, y/o la T7 RNA polimerasa, también pueden ser proporcionadas por células de mamífero 60 transformadas o por transfección de mRNA o proteína preformadas.

Se puede construir un antigenoma de PIV para uso en la presente invención, por ejemplo, ensamblando segmentos de cDNA clonado, que representan en conjunto el antigenoma completo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa o similar (PCR; descrita por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Números 4.683.195 y 4.683.202, y PCR 65 Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, 1990) de copias transcritas reversas de mRNA de PIV o RNA de genoma. Por ejemplo, se genera una primera construcción que comprende los cDNA que contienen el extremo de la banda izquierda del antigenoma, que abarca desde un promotor apropiado (por ejemplo, promotor de la T7 RNA polimerasa) y se ensambla en un vector de expresión apropiado, tal como un

plásmido, cósmido, fago, o DNA del virus vector. El vector puede ser modificado por mutagénesis y/o por inserción de un poliligante sintético que contiene sitios de restricción únicos diseñados para facilitar el ensamblaje. Para facilidad de preparación las proteínas N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas, se pueden ensamblar en uno o más vectores por separado. El extremo de la banda derecha del plásmido del antigenoma puede contener secuencias adicionales como

5 se desee, tales como una ribozima flanqueante y terminadores T7 de transcripción en tándem. La ribozima puede ser de tipo cabeza de martillo (por ejemplo, Grosfeld *et al.*, J. Virol. 69: 5677-5686, 1995), que podría dar un extremo 3' que contiene un único nucleótido no viral, o puede ser cualquiera de las otras ribozimas adecuadas tales como la del virus delta de la hepatitis (Perrotta *et al.*, Nature 350: 434-436, 1991) que podría dar un extremo 3' libre de nucleótidos no PIV. Los extremos de las bandas izquierda y derecha se unen entonces mediante un sitio de restricción común.

10

Se pueden hacer una variedad de inserciones, delecciones y reordenamientos de nucleótidos en el genoma o antigenoma de PIV durante o después de la construcción del cDNA. Por ejemplo, se pueden sintetizar secuencias deseadas de nucleótidos específicos y se pueden insertar en regiones apropiadas en el cDNA utilizando sitios de restricción convenientes. Alternativamente, se pueden usar técnicas tales como mutagénesis específica del sitio mediante alanina, mutagénesis por PCR, u otras técnicas bien conocidas en el campo para introducir mutaciones en el cDNA.

15 Los medios alternativos para construir el cDNA que codifica el genoma o antigenoma incluyen la PCR por transcripción reversa utilizando mejores condiciones de la PCR (por ejemplo, como se describe en Cheng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994) para reducir el número de componentes de la subunidad cDNA hasta sólo una o dos piezas. En otras realizaciones se pueden utilizar diferentes promotores (por ejemplo, T3, SP6) o diferentes ribozimas (por ejemplo, la del virus delta de la hepatitis). Se pueden utilizar vectores diferentes de DNA (por ejemplo, cósmidos) para la propagación para acomodarse mejor al tamaño más grande del genoma o antigenoma.

20 Los polinucleótidos aislados (por ejemplo, cDNA) que codifican el genoma o antigenoma se pueden insertar en células hospedantes apropiadas mediante transfección, electroporación, inserción mecánica, transducción o similares, en células que son capaces de soportar una infección de PIV productiva, por ejemplo, células HEp-2, FRhL-DBS2, LLC-MK2, MRC-5, y Vero. La transacción de secuencias de polinucleótidos aislados se puede introducir en células cultivadas, por ejemplo, mediante transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et al.*, Cell 14: 725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), electroporación (Neumann *et al.*, EMBO J. 1: 841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1987), transfección mediada por lípidos catiónicos (Hawley-Nelson *et al.*, Focus 15: 73-79, 1993) o un reactivo de transfección comercialmente disponible, por ejemplo, LipofectACE® (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o similares.

25 35 Como se ha indicado antes, las proteínas N, P, L y otras proteínas deseadas de PIV se pueden codificar por uno o más virus ayudadores que se distinguen fenotípicamente del que codifica el genoma o antigenoma. Las proteínas N, P, L y otras proteínas deseadas de PIV se pueden codificar también por uno o más vectores de expresión que pueden ser los mismos o separados del que codifica el genoma o antigenoma, y diferentes combinaciones de los mismos. Se pueden incluir proteínas adicionales según se desee, codificadas por su propio vector o por un vector que codifica una o más de las proteínas N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas, o el genoma o antigenoma completo.

40 45 50 55 60 Al proporcionar clones infecciosos de PIV, la invención permite un amplio intervalo de alteraciones que se producen recombinantemente dentro del genoma (o antigenoma) de PIV, dando mutaciones definidas que especifican cambios fenotípicos deseados. Por "clón infeccioso" se entiende el cDNA o su producto, sintético o de otro modo, el RNA capaz de ser incorporado directamente a los viriones infecciosos que pueden ser transcritos al RNA genómico o antigenómico capaz de servir como una plantilla para producir el genoma de partículas virales o subvirales infecciosas. Como se ha indicado antes, se pueden introducir mutaciones definidas mediante una variedad de técnicas convencionales (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio) en una copia de cDNA del genoma o antigenoma. El uso de subfragmentos de cDNA genómico o antigenómico para ensamblar un cDNA de genoma o antigenoma completo, como se describe aquí, tiene la ventaja de que cada región puede ser manipulada por separado, donde los cDNA pequeños son más fáciles de manipular que los cDNA grandes, y después se ensamblan más fácilmente en un cDNA completo. Por tanto, el cDNA de antigenoma o genoma completo, o un subfragmento seleccionado del mismo, se pueden usar como una plantilla para la mutagénesis dirigida a los oligonucleótidos. Esto puede hacerse por intermedio de una forma fágemida de cadena única, tal como utilizando el kit MUTA-gene® de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) o un método que utiliza el plásmido de cadena doble directamente como plantilla tal como el kit de mutagénesis Chameleon de Stratagen (La Jolla, CA), o mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando un cebador oligonucleótido o una plantilla que contiene la mutación o mutaciones de interés. Después, un subfragmento mutado puede ser ensamblado en el cDNA del antigenoma o genoma completo. Se conoce una variedad de otras técnicas de mutagénesis y pueden ser adaptadas rutinariamente para uso en la producción de las mutaciones de interés en un cDNA del antigenoma o genoma de PIV de la invención.

65 Así, en una realización ilustrativa se introducen mutaciones utilizando el kit de mutagénesis *in vitro* de fágemidos MUTA-gene® disponible de Bio-Rad Laboratories. En resumen, el cDNA que codifica un genoma o antigenoma de PIV es clonado en el plásmido pTZ18U, y utilizado para transformar las células CJ236 (Life Technologies). Las preparaciones de fágemidos se preparan como recomienda el fabricante. Los oligonucleótidos se diseñan para la mutagénesis mediante introducción de un nucleótido alterado en la posición deseada del genoma o antigenoma. El plásmido que contiene el genoma o antigenoma genéticamente alterado se amplifica después.

Las mutaciones pueden variar desde cambios de un único nucleótido hasta la introducción, delección o reemplazamiento de grandes segmentos de cDNA que contienen uno o más genes o segmentos genómicos. Los segmentos genómicos pueden corresponder a dominios estructurales y/o funcionales, por ejemplo, dominios citoplásmicos, transmembranales o ectodomínicos de proteínas, sitios activos tales como los sitios que median en la unión u otras

- 5 interacciones bioquímicas con diferentes proteínas, sitios epitópicos, por ejemplo, sitios que estimulan la unión de anticuerpos y/o las respuestas inmunitarias humorales o mediadas por las células, etc. Los segmentos genómicos útiles a este respecto varían desde aproximadamente 15-35 nucleótidos en el caso de segmentos genómicos que codifican pequeños dominios funcionales de proteínas, por ejemplo, sitios epitópicos, hasta aproximadamente 50, 75, 100, 200-500, y 500-1.500 o más nucleótidos.

10 La capacidad para introducir mutaciones definidas en PIV infecciosos tiene muchas aplicaciones, incluyendo la manipulación de mecanismos patógenos e inmunógenos de PIV. Por ejemplo, las funciones de las proteínas de PIV, incluyendo las proteínas N, P, M, F, HN, y L y los productos de ORF de C, D y V, pueden ser manipuladas introduciendo mutaciones que eliminan o reducen el nivel de expresión de las proteínas, o que dan proteínas mutantes. También
15 se pueden manipular rutinariamente diferentes características estructurales del RNA del genoma, tales como los promotores, regiones intergénicas, y señales de transcripción, dentro de los métodos y composiciones de la invención. Los efectos de las proteínas que actúan en *trans* y de las secuencias de RNA que actúan en *cis* sepueden determinar fácilmente, por ejemplo, utilizando un cDNA de antígenoma completo en ensayos paralelos que emplean minigenomas
20 de PIV (Dimock *et al.*, J. Virol. 67: 2772-2778, 1993), cuyo estado dependiente del rescate es útil para caracterizar a estos mutantes que pueden ser demasiado inhibidores para ser recuperados en un virus infeccioso independiente de la replicación.

Ciertas sustituciones, inserciones, delecciones o reordenamientos de genes o segmentos genómicos dentro del PIV recombinante de la invención (por ejemplo, la sustitución de un segmento genómico que codifica una proteína o
25 región proteínica seleccionada, por ejemplo una cola citoplásmica, dominio transmembranal o ectodominio, un sitio o región epitópico, un sitio o región de unión, un sitio activo o región que contiene un sitio activo, etc.) se preparan en relación estructural o funcional a un gen o segmento genómico "homólogo" existente, procedente del mismo o diferente PIV o de otra fuente. Tales modificaciones dan nuevos recombinantes que tienen los cambios fenotípicos deseados en comparación con el PIV natural o parental u otras cepas virales. Por ejemplo, los recombinantes de este
30 tipo pueden expresar una proteína químérica que tiene una cola citoplásmica y/o un dominio transmembranal de un PIV fusionado con otro ectodominio de otro PIV. Otros ejemplos de recombinantes de este tipo expresan regiones proteínicas duplicadas, tales como regiones inmunógenas duplicadas.

Como se usa aquí, los genes, segmentos genómicos, proteínas o regiones proteínicas "homólogos", proceden típicamente de fuentes heterólogas (por ejemplo, de diferentes genes de PIV, o que representan el mismo gen o segmento genómico (esto es, homólogo o alélico) en diferentes tipos o cepas de PIV). Los homólogos típicos seleccionados en este contexto comparten características estructurales generales, por ejemplo, cada homólogo puede codificar una proteína o dominio proteínico estructural comparable, tal como un dominio citoplasmático, dominio transmembranal, ectodominio, sitio o región de unión, sitio o región epitópico, etc. Los dominios homólogos y sus segmentos genómicos codificadores abarcan un ensamblaje de especies que tienen un rango de tamaño y variaciones de secuencia definidos por una actividad biológica común entre las variantes del dominio o segmento genómico.

Los genes y segmentos genómicos homólogos, así como otros polinucleótidos descritos aquí para producir el PIV recombinante dentro de la invención, comparten a menudo una identidad sustancial de secuencia con una "secuencia de referencia" de polinucleótidos seleccionada, por ejemplo, con otra secuencia homóloga seleccionada. Como se usa aquí, una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para la comparación de secuencias, por ejemplo, un segmento de un cDNA o gen de longitud completa, o una secuencia de cDNA o gen completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud. Puesto que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (esto es, una porción de la secuencia completa de polinucleótidos) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa aquí, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones contiguas de nucleótidos en el que las secuencias de polinucleótidos pueden ser comparadas con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (esto es, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni delecciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

60 El alineamiento óptimo de las secuencias para el alineamiento de una ventana de comparación se puede llevar a cabo por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981), por el algoritmo de alineamiento de la homología de Needleman & Wunsch, (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970), por la investigación del método de similitud de Pearson & Lipman, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA85: 2444, 1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (esto es, el que produce el más alto porcentaje de similitud de secuencia en la ventana de comparación) generado por los diferentes métodos. El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias

de polinucleótidos son idénticas (esto es, en una base nucleótido-por-nucleótido) en la ventana de comparación. El término “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que hay idéntica base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) en ambas secuencias para dar el número de posiciones concordantes, dividiendo el número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (esto es, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos “identidad sustancial” como se usa aquí indica una característica de una secuencia de polinucleótidos, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más comúnmente al menos 99 por ciento de identidad de

- 5 secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, frecuentemente en una ventana de comparación de al menos 25-50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia de polinucleótidos que puede incluir delecciones o adiciones que son en total 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.
- 10
- 15

En adición a estas relaciones de la secuencia de polinucleótidos, se seleccionan también típicamente proteínas y regiones de proteínas codificadas por el PIV recombinante de la invención, para tener relaciones conservadoras, esto es para tener una identidad sustancial de secuencia o similitud de secuencia, con los polipéptidos de referencia seleccionados. Cuando se aplica a los polipéptidos, el término “identidad de secuencia” significa péptidos que comparten 20 idénticos aminoácidos en las posiciones correspondientes. El término “similitud de secuencia” significa péptidos que tienen idénticos o similares aminoácidos (esto es, sustituciones conservadoras) en las posiciones correspondientes. El término “identidad sustancial de secuencia” significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como por los programas GAP o BESTFIT que utilizan por defecto los pesos de los huecos, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad de secuencia). El término “similitud sustancial” significa que dos secuencias peptídicas comparten los correspondientes porcentajes de similitud de la secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene 25 cadenas laterales alifáticas es el de glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales con hidroxilo alifático es el de serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen grupo amido es el de asparragina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es el de fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es el de lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es 30 el de cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparragina-glutamina. Las abreviaturas para los veinte aminoácidos presentes en la naturaleza utilizados aquí siguen el uso convencional (*Immunology - A Synthesis*, 2nd ed., E. S. Golub & D. R. Gren, eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1991). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos 35 α,α -disustituidos, los N-alquil-aminoácidos, el ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetillisina, ϵ -N-acetillisina, O-fososerina, N-acetilserina, N-formilmctionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina, y otros aminoácidos similares 40 y los iminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). Además, se pueden modificar los aminoácidos por glucosilación, fosforilación y similares.

Para seleccionar los virus candidatos para la vacuna, los criterios de viabilidad, atenuación e inmunogenicidad se determinan según métodos bien conocidos. Los virus que serán los más deseados en las vacunas deben mantener la viabilidad, tener un fenotipo de atenuación estable, presentar replicación en un hospedador inmunizado (aunque a 50 niveles más bajos), y provocar de modo efectivo la producción de una respuesta inmunitaria en un vacunado suficiente para conferir protección frente a una grave enfermedad causada por la subsiguiente infección por el virus natural. Los PIV recombinantes de la invención no sólo son viables y más apropiadamente atenuados que los previos candidatos a vacunas, sino que son más estables genéticamente *in vivo*, reteniendo la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria protectora y en algunos casos extender la protección ofrecida por múltiples modificaciones, por ejemplo, inducir 55 la protección frente a diferentes cepas o subgrupos virales, o la protección mediante una base inmunológica diferente, por ejemplo, inmunoglobulinas secretoras frente a inmunoglobulinas séricas, inmunidad celular, y similares.

Los PIV recombinantes de la invención se pueden ensayar en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos y generalmente aceptados, para confirmar la atenuación adecuada, la resistencia a la reversión fenotípica, y la inmunogenicidad para uso en la vacuna. En los ensayos *in vitro*, el virus modificado (por ejemplo, un PIV de origen biológico o recombinante, con una multiplicidad de atenuación), se ensaya por ejemplo, en cuanto al nivel de replicación, la sensibilidad a la temperatura de la replicación del virus, esto es fenotipo ts, y en cuanto al fenotipo de las placas pequeñas u otro fenotipo deseado. Los virus modificados se ensayan además en modelos animales de infección por PIV. Una variedad de modelos animales ha sido descrita y está resumida en diferentes referencias mencionadas aquí. Los 60 sistemas de modelos de PIV, incluyendo roedores y primates no humanos, para evaluar la atenuación y la actividad inmunógena de los candidatos a vacuna de PIV, son ampliamente aceptados en la técnica, y los datos obtenidos de los mismos están bien correlacionados con la infección, atenuación e inmunogenicidad de PIV en los seres humanos.

De acuerdo con la descripción mencionada, se describen también composiciones virales de PIV infecciosos, recombinante, aislado, para uso en vacuna. El virus atenuado que es un componente de una vacuna está en una forma aislada y típicamente purificada. Por aislado se entiende que se refiere al PIV que está en otro entorno diferente al nativo de un virus natural, tal como la nasofaringe de un individuo infectado. Más en general, aislado significa incluir el virus atenuado como un componente de un cultivo celular u otro medio artificial en el que puede ser propagado y caracterizado en un entorno controlado. Por ejemplo, los PIV atenuados se pueden producir por un cultivo celular infectado, separar del cultivo celular y añadir a un estabilizante.

Para uso en la vacuna, el PIV recombinante producido según la presente invención se puede utilizar directamente en formulaciones de vacuna, o se puede liofilizar, como se deseé, utilizando protocolos de liofilización bien conocidos por los expertos. El virus liofilizado será mantenido típicamente a aproximadamente 4°C. Cuando está listo para su uso el virus liofilizado se reconstituye en una solución estabilizante, por ejemplo, solución salina o que comprende SPG, Mg⁺⁺ y HEPES, con o sin adyuvante, como se describe adicionalmente más adelante.

Las vacunas de PIV como se describen aquí contienen como ingrediente activo una cantidad inmunogénicamente efectiva de PIV producido como se describe aquí. El virus modificado puede ser introducido en un hospedador con un vehículo y/o adyuvante fisiológicamente aceptable. Los vehículos útiles son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para su uso como tales, o pueden ser liofilizadas, siendo combinada la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración, como se ha mencionado antes. La composición puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, y similares. Los adyuvantes aceptables incluyen el adyuvante incompleto de Freund, MPL™ (monofosforil lípido A 3-o-desacilado; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT.) y IL-12 (Genetics Institute, Cambridge MA), entre muchos otros adyuvantes adecuados bien conocidos en la técnica.

En la inmunización con una composición de PIV como se describe aquí, vía aerosol, gotitas, vía oral, tópica u otra vía, el sistema inmunitario del hospedador responde a la vacuna produciendo anticuerpos específicos para las proteínas del virus PIV, por ejemplo, glucoproteínas F y HN. Como resultado de la vacunación con una cantidad inmunogénicamente efectiva de PIV producido como se describe aquí, el hospedador llega a ser al menos parcialmente o completamente inmune a la infección por PIV, o resistente para desarrollar una infección por PIV moderada o grave, particularmente del tracto respiratorio inferior.

El hospedador al que se administran las vacunas puede ser cualquier mamífero que sea susceptible a la infección por PIV o un virus estrechamente relacionado y dicho hospedador es capaz de generar una respuesta inmunitaria protectora para los antígenos de la cepa de vacunación. Por consiguiente, se describen métodos para crear vacunas para una variedad de usos humanos y veterinarios.

Las composiciones de vacuna que contienen el PIV de la invención se administran a un hospedador susceptible a una infección o que está de otra manera en riesgo de infección por PIV para mejorar las propias capacidades de respuesta inmunitaria del hospedador. Tal cantidad se define como una "dosis inmunogénicamente efectiva". En este uso, la cantidad precisa de PIV a ser administrada dentro de una dosis efectiva dependerá del estado de salud y peso del hospedador, del modo de administración, de la naturaleza de la formulación, etc., pero generalmente variará desde aproximadamente 10³ hasta aproximadamente 10⁷ unidades formadoras de placas (PFU) o más, de virus por hospedador, más comúnmente de aproximadamente 10⁴ a 10⁶ PFU de virus por hospedador. En cualquier caso, las formulaciones de vacuna deben proporcionar una cantidad de PIV modificado de la invención suficiente para proteger de forma efectiva al paciente hospedador frente a una infección por PIV grave o de riesgo para la vida.

El PIV producido de acuerdo con la presente invención se puede combinar con virus de otros serotipos o cepas de PIV para conseguir la protección frente a múltiples serotipos o cepas de PIV. Alternativamente, la protección frente a múltiples serotipos o cepas de PIV se puede conseguir combinando epítipos protectores de múltiples serotipos o cepas incluidos por ingeniería genética en un virus, como se describe aquí. Típicamente cuando se administran diferentes virus, estarán mezclados y se administrarán simultáneamente, pero también se pueden administrar por separado. La inmunización con una cepa puede proteger frente a diferentes cepas del mismo o diferente serotipo.

En algunos casos puede ser deseable combinar las vacunas de PIV descritas aquí con vacunas que inducen respuestas protectoras a otros agentes, particularmente otros virus de la infancia. Se puede emplear el PIV como un vector para los antígenos protectores de otros patógenos, tales como el virus sincitial respiratorio (RSV) o el virus del sarampión, incorporando las secuencias que codifican estos antígenos protectores en el genoma o antigenoma del PIV que se usa para producir PIV infeccioso, como se describe aquí (véase, por ejemplo, la solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. de Serie 60/170.195, presentada el 10 de diciembre de 1999 by Murphy *et al.*).

En todos los sujetos, la cantidad precisa de vacuna de PIV recombinante administrada, y el tiempo y repetición de la administración, serán determinados basándose en el estado de salud y peso del paciente, el modo de administración, la naturaleza de la formulación, etc. Las dosis generalmente variarán desde aproximadamente 10³ hasta aproximadamente 10⁷ unidades formadoras de placas (PFU) o más, de virus por paciente, más comúnmente de aproximadamente

10^4 a 10^6 PFU de virus por paciente. En cualquier caso, las formulaciones de vacuna deben proporcionar una cantidad de PIV atenuado suficiente para estimular o inducir efectivamente una respuesta inmunitaria anti-PIV, como se puede determinar por ejemplo, por fijación del complemento, neutralización de placas, y/o ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas, entre otros métodos. A este respecto, los individuos son monitorizados también en cuanto a signos

- 5 y síntomas de enfermedad respiratoria superior. Como con la administración a monos rhesus, el virus atenuado de la vacuna crece en la nasofaringe de los vacunados a niveles aproximadamente 10 veces o más bajos que el virus natural, o aproximadamente 10 veces o más bajos cuando se comparan con los niveles de PIV incompletamente atenuado.

En los neonatos y lactantes, puede ser necesaria la administración múltiple para provocar suficientes niveles de 10 inmunidad. La administración debería empezar dentro del primer mes de vida, y a intervalos a lo largo de la infancia, tal como a los dos meses, seis meses, un año y dos años, según sea necesario para mantener niveles suficientes de protección frente a la infección por el PIV nativo (natural). Similarmente, los adultos que son particularmente susceptibles a infección por PIV repetida o grave, tal como, por ejemplo, los trabajadores sanitarios, los trabajadores de 15 guarderías, familiares de niños pequeños, los ancianos, los individuos con la función cardiopulmonar afectada, pueden requerir inmunizaciones múltiples para establecer y/o mantener respuestas inmunitarias protectoras. Los niveles de 20 inmunidad inducida pueden ser monitorizados midiendo las cantidades de anticuerpos neutralizantes secretores y séricos, y las dosis pueden ser ajustadas o las vacunaciones repetidas según sea necesario para mantener los niveles deseados de protección. Además, diferentes virus de vacuna pueden estar indicados para administración a diferentes grupos receptores. Por ejemplo, una cepa de PIV preparada por ingeniería genética que expresa una citocina o una proteína adicional rica en epítopos de la célula T puede ser particularmente ventajosa para los adultos más que para los lactantes.

Las vacunas de PIV producidas como se describe aquí, se pueden combinar con virus que expresan antígenos de otro subgrupo o cepa de PIV para conseguir protección frente a múltiples subgrupos o cepas de PIV. Alternativamente, 25 el virus de vacuna puede incorporar epítopos protectores de múltiples cepas o subgrupos de PIV preparados en un clon de PIV, como se describe aquí.

Las vacunas de PIV pueden provocar la producción de una respuesta inmunitaria que es protectora frente a graves 30 enfermedades del tracto respiratorio inferior, tales como neumonía y bronquiolitis cuando el individuo es subsiguientemente infectado con el PIV natural. Aunque el virus que circula naturalmente es todavía capaz de causar la infección, particularmente en el tracto respiratorio superior, hay una posibilidad extremadamente reducida de rinitis como resultado de la vacunación y posible refuerzo de la resistencia por la subsiguiente infección por el virus natural. Después de la vacunación, hay niveles detectables de anticuerpos séricos y secretores engendrados por el hospedador que son capaces de neutralizar el virus homólogo (del mismo subgrupo) natural *in vitro* e *in vivo*. En muchos casos los anticuerpos 35 del hospedador neutralizarán también el virus natural de un subgrupo diferente, no de la vacuna.

Los PIV candidatos para la vacuna preferidos, presentan una disminución muy sustancial de la virulencia cuando se comparan con el virus natural que circula naturalmente en los seres humanos. El virus está suficientemente atenuado de forma que los síntomas de infección no aparecerán en la mayor parte de los individuos inmunizados. En algunos casos 40 el virus atenuado puede ser todavía capaz de diseminación en los individuos no vacunados. Sin embargo, su virulencia está suficientemente disminuida de tal modo que no tienen lugar las infecciones graves del tracto respiratorio inferior en el hospedador vacunado o incidental.

El nivel de atenuación de los candidatos para la vacuna de PIV se puede determinar, por ejemplo, cuantificando 45 la cantidad de virus presente en el tracto respiratorio de un hospedador inmunizado y comparando esta cantidad con la producida por el PIV natural u otros PIV atenuados que han sido evaluados como cepas candidatos para la vacuna. Por ejemplo, el virus atenuado puede tener un mayor grado de restricción de la replicación en el tracto respiratorio superior de un hospedador altamente susceptible, tal como un chimpancé, o mono rhesus, comparado con los niveles 50 de replicación del virus natural, por ejemplo, 10 a 1000 veces menos. Con el fin de reducir además el desarrollo de la rinorrea, que se asocia con la replicación del virus en el tracto respiratorio superior, un virus candidato ideal para la vacuna debería presentar un nivel restringido de replicación tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior. Sin embargo, los virus atenuados deben ser suficientemente infecciosos e inmunógenos en los seres humanos como para conferir protección a los individuos vacunados. Los métodos para determinar los niveles de PIV en la nasofaringe 55 de un hospedador infectado son bien conocidos en la bibliografía.

Los niveles de inmunidad inducida proporcionados por las vacunas se pueden monitorizar también midiendo las 55 cantidades de anticuerpos neutralizantes secretores y séricos. Basándose en estas medidas, se pueden ajustar las dosis de vacuna o se pueden repetir las vacunaciones según sea necesario para mantener los niveles de protección deseados. Además, virus diferentes de vacuna pueden ser ventajosos para diferentes grupos receptores. Por ejemplo, una cepa de 60 PIV preparada por ingeniería genética que expresa una proteína adicional rica en epítopos de las células T puede ser particularmente ventajosa para los adultos más que para los lactantes.

Además, el PIV se puede emplear como un vector para la terapia génica transitoria del tracto respiratorio. El genoma o antigenoma de PIV recombinante puede incorporar una secuencia que es capaz de codificar un producto genético de interés. El producto genético de interés está bajo el control del mismo o diferente promotor del que controla la expresión 65 de PIV. Se administra a un paciente el PIV infeccioso producido mediante la coexpresión del genoma o antigenoma de PIV recombinante con las proteínas N, P, L y otras proteínas deseadas del PIV, y que contiene una secuencia que codifica el producto genético de interés. La administración es típicamente por aerosol, nebulizador, u otra aplicación

tópica al tracto respiratorio del paciente que se trata. El PIV recombinante se administra en una cantidad suficiente para producir la expresión de niveles terapéuticos o profilácticos del producto génico deseado. Los productos genéticos representativos que se pueden administrar dentro de este método son preferiblemente adecuados para expresión transitoria, incluyendo, por ejemplo, interleucina-2, interleucina-4, gamma-interferón, GM-CSF, G-CSF, eritropoyetina, y otras citocinas, glucocerebrosidasa, fenilalanina-hidroxilasa, regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa, citotoxinas, genes supresores de tumor, los RNA antisentido, y antígenos de vacuna.

Los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración, no de limitación.

10 Ejemplo I

Construcción de los cDNA que codifican un antigenoma químérico de HPIV3/BPIV3 y recuperación de los virus infecciosos

15 Los tres ejemplos siguientes documentan estudios para identificar cuales de las proteínas de BPIV3 contribuyen a su restricción del rango de hospedadores en los primates. Para ilustrar estos métodos, la proteína N del virus HPIV3 natural fue reemplazada con su homólogo de BPIV3. Este intercambio se llevó a cabo utilizando un sistema de genética reversa para recuperación de PIV infeccioso a partir de cDNA como se ha descrito antes. Se iniciaron los estudios con el gen N de BPIV3 porque esta proteína tiene un nivel intermedio de diferencia de la secuencia de aminoácidos con su homólogo de HPIV3 en comparación con otras proteínas de HPIV3 y BPIV3 (véase el Ejemplo I).

20 25 30 Se construyó un virus recombinante químérico en el que el ORF de N de la cepa JS de HPIV3 fue reemplazado por el de la cepa Ka o el de la cepa SF de BPIV3 (Fig. 1). Estos virus químéricos tienen las glucoproteínas HN y F del HPIV3 parental e inducirán un alto nivel de inmunidad frente a HPIV3 en los primates. Ambos virus químéricos fueron recuperados satisfactoriamente. Ambos crecieron hasta títulos altos en cultivo celular y se encontró que ambos eran atenuados en los monos rhesus. Así, la proteína N fue identificada como un ejemplo de proteína que contribuye al fenotipo del rango de hospedadores de BPIV3. La inmunización de los monos rhesus con cualquiera de los virus recombinantes químéricos Ka o SF, indujo un alto nivel de resistencia a la replicación de HPIV3 usado como un enfrentamiento natural.

35 La presente invención, por tanto, establece la utilidad de los métodos de genética reversa para generar un virus PIV químérico humano-bovino que combina las propiedades de atenuación del rango de hospedadores de BPIV3 y la inmunogenicidad de los antígenos protectores HN y F de HPIV3. La inmunización de los seres humanos con dicho recombinante químérico corregirá el problema de la inmunogenicidad subóptima de la vacuna de BPIV3 observado previamente en los seres humanos.

40 45 La secuencia de nucleótidos de consenso, completa, para cada una de las cepas Ka o SF de BPIV3 se determinó a partir de los productos de la RT-PCR generados del RNA del virión. Estas secuencias se detallan en las figuras 6A-6G, y en las figuras 7A-7G, respectivamente. El cDNA de longitud completa que codifica un RNA antigenómico completo de Ka de BPIV3 de 15456 nucleótidos (nt) se detalla aquí en las figuras 6A-6G (véase también GenBank Nº de acceso AF178654). La secuencia de GenBank para la cepa kansas de BPIV3 difiere de la secuencia del ejemplo de cDNA en dos posiciones, en los nucleótidos 21 y 23. Ambas, la secuencia publicada y la secuencia del ejemplo de cDNA se presentan naturalmente en la población de virus de la cepa kansas con frecuencias similares. El cDNA utilizado en el presente ejemplo contiene una secuencia que empieza en el nucleótido 18, ACTGGTT (SEQ ID NO. 1), mientras que la correspondiente secuencia publicada (GenBank Nº de acceso AF178654; Figuras 6A-6G, SEQ ID NO. 22) es ACTTGCT (los nucleótidos que difieren en las posiciones 21 y 23 están subrayados).

50 55 Para construir la secuencias de nucleótidos de consenso para las cepas Ka y SF de BPIV3, se sometió el RNA del virión a transcripción inversa utilizando el sistema Superscript II Preamplification System (Life Technologies, Gaithersburg, MD.) y 200 ng de cebadores hexámeros aleatorios. Se llevó a cabo la PCR en el primer producto de cadena utilizando el kit para la PCR de cDNA, Advantage (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA.). Se amplificaron cada uno de los genomas Ka y SF por la PCR en 3 o 4 fragmentos solapados utilizando cebadores homólogos para las regiones de RNA conservadas entre las secuencias de paramixovirus publicadas previamente. Se construyó cada par de cebadores para incluir la concordancia de los sitios de restricción de la enzima (no representados en la secuencia elegida para amplificación).

60 65 70 Se generó una genoteca aleatoria separada para cada amplicón digiriendo un conjunto de productos de la PCR con las apropiadas enzimas de restricción, seguido por la purificación en gel, ligamiento de los productos en ordenamientos en tandem y ultrasonidos. Se generó una genoteca aleatoria a partir de este conjunto de secuencias de cDNA compartidas, clonando un subconjunto (aproximadamente fragmentos de 500 bp) en M 13. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los insertos de cDNA mediante secuenciación automática del DNA utilizando el kit de secuenciación en ciclo Taq DYE Deoxy Terminator (ABI, Foster City, CA). Se ensambló una secuencia continua (contigua) para cada uno de los fragmentos originales grandes de la RT-PCR con suficiente redundancia de modo que la posición de cada nucleótido fue confirmada por un mínimo de 3 clones independientes de M13. Las secuencias genómicas terminales en 5' y 3' de Ka y SF se convirtieron en cDNA utilizando el sistema Rapid Amplification of cDNA Ends (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y se secuenciaron por secuenciación automática.

Estas secuencias se detallan en las Figuras 6A-6G (Ka) y en las Figuras 7A-7G (SF), respectivamente. El análisis de estas secuencias reveló que el porcentaje de la identidad de aminoácidos entre HPIV3 y BPIV3 para cada una de las siguientes proteínas es: N (86%), P (65%), M (93%), F (83%), HN (77%), y L (91%). Así se encontró la divergencia de secuencias distribuida sobre muchos genes. La secuencia de aminoácidos deducida de los genes N de estos dos virus se presenta en GenBank Nº AF178654 (Ka) y Nº AF178655 (SF), no incluidos. La posición del ORF de N en el genoma de BPIV3 está indicada en los respectivos informes de GenBank. En el ejemplo que sigue, el ORF de N del virus Ka o SF se seleccionó inicialmente para el reemplazamiento del correspondiente gen en el virus HPIV3 porque el gen N representa un gen con un nivel intermedio de divergencia de secuencia entre las seis proteínas de HPIV3 y BPIV3. En este estudio se cambió el ORF de N, pero no las secuencias no codificadoras en 3' o 5', del gen N, lo que permitió asignar un fenotipo de atenuación observado de cKa y cSF a la proteína codificada por el gen N.

Se construyeron genomas de PIV3 químéricos humano-bovinos de longitud completa introduciendo las regiones codificadoras N de Ka o SF de BPIV3 como un reemplazo de su homólogo de HPIV3 en el rJS cDNA p3/7(131)2G que codifica una copia completa de RNA antigenómico de HPIV3 de sentido positivo (véase, por ejemplo, Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*; Hoffman *et al.*, 1997, *cita anterior*; Skiadopoulos *et al.*, 1998, *cita anterior*; solicitud de patente de Estados Unidos No. de Serie 09/083.793, presentada el 22 de mayo de 1998; solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/047.575, presentada el 23 de mayo de 1997 (correspondiente a la publicación internacional No. WO 98/53078), y solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/059.385, presentada el 19 de septiembre de 1997). Las regiones codificadoras N de BPIV3 y HPIV3 con secuencias flanqueantes fueron subclonadas en primer lugar y después modificadas para permitir un cambio sólo del ORF de N. El pUC119JSN que lleva el gen N de HPIV3 y los plásmidos con un gen N de Ka o SF de BPIV3 (pBSKaN y pBSSFN) se sometieron a mutagénesis utilizando el método de Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA82: 488-492, 1985) para introducir los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción, NcoI y AflII, en los sitios de iniciación y terminación de la traducción, respectivamente (Fig. 1A). Después de la digestión con NcoI/AflII de pUC119KaN-NcoI/AflII, se introdujo la región codificadora N de BPIV3 como un fragmento NcoI/AflIII en el pUC119JSN-NcoI/AflII como un reemplazo para la región codificadora N de HPIV3 (Fig. 1B). Los genes N químéricos, que contienen las secuencias no codificadoras en 3' y 5' de HPIV3 y el ORF de BPIV3, fueron modificados por mutagénesis dirigida al sitio para restaurar la secuencia no codificadora original de HPIV3 y la secuencia codificadora de BPIV3. Este gen N químérico se introdujo entonces en la mitad 5' del antigenoma rJS, pLeft, en intercambio por su correspondiente secuencia de HPIV3 (Figuras 2A y 2B) utilizando los sitios existentes M1ul y EcoRI presentes en la secuencia humana. En cada caso se llevaron a cabo reacciones paralelas para el ORF de N de SF. El plásmido pLeft químérico se combinó con el fragmento Xhol/NgoMI procedente de pRight que contiene la mitad 3' del antigenoma rJS flanqueada por la ribozima delta y el terminador T7 en su extremo 3' (Fig. 2). Los plásmidos químéricos de PIV3 resultantes denominados pB/HPIV3NKa o pB/HPIV3NSF, contenían el antigenoma rJS de longitud completa en el cual el ORF de N codificaba la proteína N de Ka o SF de BPIV3.

Se transfectaron los cDNA antigenómicos químéricos de HPIV3/BPIV3 individualmente a células HEp-2 cultivadas hasta casi confluencia en placas de 6 pocillos junto con dos plásmidos de soporte descritos previamente, pTM (P no C) y pTM(L), Lipofectace (Life Technologies, Gaithersburg, MD), y se infectaron con un virus vaccinia recombinante modificado que expresa el bacteriófago T7 RNA polimerasa (MVA-T7) como se ha descrito previamente (Durbin *et al.*, Virology234: 74-83, 1997b). Un plásmido soporte N usado en trabajos previos fue omitido porque el plásmido antigenómico expresaba niveles suficientes de la proteína N. Se mantuvieron los cultivos durante 3,5 días a 32°C, tras lo cual se recogieron los sobrenadantes, se pasaron por células LLC-MK2 y se purificaron las placas 3 veces en células LLC-MK2. Las identidades de los virus químéricos que incorporan un genoma o antigenoma de fondo de PIV3 humano y una proteína N de BPIV3 (denominados como virus químéricos recombinantes rHPIV3-N_B o, más específicamente, como virus químéricos "cKa" y "cSF") recuperados de las transfecciones fueron confirmadas por secuenciación de los productos de la RT-PCR que contienen las regiones de los codones de iniciación y de terminación del ORF de N procedentes del RNA del virión aislado después de amplificación de virus purificado en placas por triplicado (Fig. 3). Este producto amplificado y las correspondientes secuencias amplificadas de HPIV3 rJS y BPIV3 Ka o SF se sometieron también a digestión con TaqI para confirmar la identidad químérica de los virus cKa y cSF (Fig. 4). Los perfiles de digestión por TaqI fueron distintos para los 3 virus parentales y los 2 virus químéricos, y cada perfil parental incluía fragmentos de TaqI de un único tamaño, permitiendo la contribución de la secuencia de los rJS, Ka y SF parentales para los virus químéricos a ser verificados. Los recombinantes químéricos cKa y cSF recuperados, contenía cada uno las secuencias esperadas como se había diseñado.

Ejemplo II

60 Replicación de virus químéricos HPIV3/BPIV3 en cultivo celular

La replicación eficiente de vacunas de virus vivos atenuados en células de cultivo de tejidos es una característica del PIV químérico humano-bovino de la invención que permite la fabricación eficiente de los materiales de la vacuna recombinante. La replicación multiciclo de rJS parental, cKa, Ka parental, cSF, y SF parental en una línea celular bovina (MDBK) y en una línea celular de simio (LLC-MK2) fue determinada infectando células con virus en una multiplicidad de infección de 0,01 y recogiendo muestras (por triplicado) a lo largo de un periodo de tiempo de cinco días (Fig. 5) como se ha descrito previamente (Tao *et al.*, 1998, *cita anterior*).

ES 2 312 347 T3

Los virus químéricos se replicaron eficientemente en ambas líneas celulares lo mismo que sus virus parentales humanos o bovinos sin retraso significativo en la replicación ni una significativa reducción en el título de virus obtenido. En cada caso, el virus químérico se replicó hasta más de $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml que está muy por encima de la dosis de $10^{4.0}$ o $10^{5.0}$ de las vacunas de PIV humanos o bovinos vivos atenuados que se están usando actualmente en ensayos clínicos humanos (Karron *et al.*, 1996, *cita anterior*; Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*; y Karron *et al.*, 1995b, *cita anterior*).

Ejemplo III

10 Evaluación de la atenuación y eficacia protectora de los virus químéricos HPIV3/BPIV3 en monos Rhesus

Tanto el SF como el Ka de BPIV3 son atenuados para el tracto respiratorio superior y el inferior del mono rhesus (van Wyke Coelingh *et al.*, 1988, *cita anterior*). Este fenotipo de atenuación se correlaciona con la atenuación en los seres humanos (Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*) como se indica por el hecho de que Ka está altamente restringido en la replicación en el tracto respiratorio superior de los lactantes y niños seronegativos totalmente susceptibles. La ausencia de tos, obstrucción laríngea, bronquiolitis, o neumonía en los vacunados infectados por BPIV3 da a entender que el virus Ka BPIV3 es atenuado también para el tracto respiratorio inferior. Por tanto, el mono rhesus está ampliamente aceptado como un modelo razonablemente correlativo para evaluar la atenuación de los virus PIV candidatos para la vacuna y su eficacia frente al enfrentamiento con el PIV natural.

20 Se administraron intranasalmente e intratraquealmente los rJS, cKa, Ka parental, cSF, y SF parental en una dosis de $10^{5.0}$ TCID₅₀ por sitio a los monos rhesus. Se monitorizó la replicación utilizando los procedimientos descritos previamente para obtener muestras del tracto respiratorio superior (muestras de frotis nasofaríngeo) y tracto respiratorio inferior (muestras de lavado traqueal) y para titular el virus en células LLC-MK2 (Hall *et al.*, 1992, *cita anterior*).
25 Los cKa y cSF recombinantes fueron significativamente atenuados para el tracto respiratorio superior (Tabla 1) presentando, respectivamente, una reducción de 63 veces o una reducción de 32 veces en la media de los picos del título de virus en comparación con la del rJS HPIV3 parental. Ambos, cKa y cSF, fueron también atenuados para el tracto respiratorio inferior, pero esta diferencia fue sólo estadísticamente significativa para cSF. El bajo nivel de replicación de rJS en el tracto respiratorio inferior hizo difícil demostrar de una forma estadísticamente significativa la restricción adicional de replicación debida a un fenotipo de atenuación en este sitio.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 312 347 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 1. La replicación de cKa y cSF está restringida en relación con el HPIV3 en los tractos respiratorios superior e inferior de monos rhesus. Replicación de virus

Virus inmunitante	Nº de animales	Media de los títulos						Media de los picos de los títulos $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml} \pm \text{error estándar [agrupamiento Duncan]}$	
		Nasofaringe			Tráquea				
		día 6	día 7	día 4	día 6	dia 4	dia 6		
rJS	4	5,3 ± 0,59[A]	3,9 ± 0,36[A]	1,7 ± 0,45[A]	1,7 ± 0,29[A]	5,3 ± 0,59[A]	2,5 ± 0,51[A]		
cKa	4	3,0 ± 0,58[B]	2,9 ± 0,42[AB]	1,5 ± 0,40[A]	1,0 ± 0,19[A]	3,5 ± 0,54[B]	1,5 ± 0,18[AB]		
Ka	4	2,0 ± 0,27[B]	2,4 ± 0,30[B]	1,3 ± 0,26[A]	1,3 ± 0,21[A]	2,5 ± 0,30[B]	1,6 ± 0,15[AB]		
cSF	4	3,3 ± 0,40[B]	3,7 ± 0,57[A]	1,1 ± 0,25[A]	1,1 ± 0,24[A]	3,8 ± 0,46[B]	1,4 ± 0,26[B]		
SF	4	2,8 ± 0,48[B]	2,6 ± 0,40[AB]	1,6 ± 0,46[A]	1,5 ± 0,40[A]	3,3 ± 0,28[B]	1,8 ± 0,41[AB]		

¹ Los monos fueron inoculados intranasalmente e intratraquealmente con $10^{5,0} \text{ TCID}_{50}$ en 1 ml en cada sitio.

² La media de los títulos virales en cada columna fue asignada a grupos estadísticamente similares (designados con una letra) utilizando un test de Duncan de rango múltiple ($\alpha = 0,05$). La media de los títulos en cada columna con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

El nivel de replicación de cada virus quimérico, cKa y cSF, no fue significativamente diferente de su parental bovino en el tracto respiratorio superior o inferior, aunque los virus quiméricos se replicaron cada uno algo mejor que sus BPIV3 parentales en el tracto respiratorio superior. Por tanto, la adquisición del gen N de cualquiera de los Ka o SF de BPIV3 por rJS HPIV3 atenuó al virus humano para los monos rhesus a un nivel aproximadamente equivalente

5 al del BPIV parental. Puesto que los HPIV3/BPIV3 quiméricos recombinantes se replicaron eficientemente en células de cultivo de tejidos *in vitro*, es claro que el fenotipo de la replicación restringida por el rango de hospedadores manifestado por los dos virus parentales bovinos fue transferido al HPIV3 por el ORF de N. Es posible, pero desconocido e imprevisible, que la sustitución por otros genes de BPIV3, tales como M, P, o L, de sus homólogos HPIV3 en rJS dará niveles similares o mayores de atenuación como se observa después de la sustitución del gen N de HPIV3 por el gen N de BPIV3. La observación de que el nivel de replicación de cKa y cSF es ligeramente mayor que el de sus BPIV3 parentales en el tracto respiratorio superior sugiere que genes bovinos adicionales contribuyen al fenotipo de atenuación del rango de hospedadores del virus BPIV3 parental en este sitio.

10 Los monos no inoculados y los monos que fueron previamente infectados con un virus PIV3 parental humano o bovino, o con el virus quimérico cKa o cSF, fueron enfrentados 42 días después de la inoculación inicial con $10^{6.0}$ TCID₅₀ de rJS intranasalmente e intratraquealmente en un inóculo de 1 ml en cada sitio. Se tomaron muestras de la nasofaringe y de la tráquea como se ha descrito previamente en los días indicados en la Tabla 2. Se determinó el título de virus presente en cada sitio para cada mono en monocapas de células LLC-MK2, y los títulos presentados son la media de los picos de los títulos (Hall *et al.*, 1992, *cita anterior*). La infección previa con cualquier virus quimérico indujo un alto nivel de resistencia a la replicación del virus de enfrentamiento rJS tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior. Los monos previamente infectados con cKa manifestaron una reducción de 300 veces en la replicación del HPIV3 (rJS) natural en el tracto respiratorio superior y una reducción de 1000 veces en el tracto inferior en comparación con los monos control no inoculados. Los monos previamente infectados con cSF manifestaron una reducción de 2000 veces en la replicación de rJS en el tracto respiratorio superior y una reducción de 1000 veces en el tracto inferior en comparación con los monos control no inoculados. El nivel de reducción de la replicación del virus de enfrentamiento rJS en los monos previamente inoculados con cKa o cSF fue comparable al de los monos previamente infectados con cualquiera de los PIVs parentales, bovino o humano. Por tanto, la infección con cualquier virus quimérico HPIV3/BPIV3 proporcionó un alto nivel de protección en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos, y ambos virus quiméricos representan candidatos prometedores para la vacuna.

20 30 35 40 El suero recogido de los monos los días 0 y 28 se analizó por el ensayo HAI utilizando HPIV3 (cepa JS) y BPIV3 (cepa Ka) como antígeno como se ha descrito previamente (Coelingh *et al.*, J. Infect. Dis. 157: 655-662, 1988). Aunque cKa-N y cSF-N estaban altamente atenuados en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos rhesus en relación con el rJS, cada virus quimérico indujo una respuesta de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HAI) frente al HPIV3 que fue 2,5 a 5 veces superior en magnitud que la inducida por la inmunización con su respectivo BPIV3 parental. Esto es debido probablemente a la presencia de la proteína HN de HPIV3 en los virus quiméricos. Además, las respuestas HAI específicas de HPIV3 inducidas por los virus quiméricos fueron estadísticamente indistinguibles de las inducidas por la inmunización con rJS. Un resultado adicional inesperado demostrado aquí es que, después del enfrentamiento de los monos con HPIV3, el nivel de anticuerpos HAI en los monos inicialmente inmunizados con cKa-N o cSF-N fue significativamente mayor que los niveles observados en los animales inmunizados con rJS, Ka o SF.

Ejemplo IV

45 *Construcción y caracterización de HPIV3/BPIV3 quiméricos, candidatos para la vacuna, que tienen glucoproteínas heterólogas de fusión y hemaglutinina-neuraminidasa*

En el ejemplo precedente, la base de la restricción de replicación por el rango de hospedadores de BPIV3 para el tracto respiratorio de los primates fue examinada mediante la generación y caracterización de un PIV3 recombinante humano (rHPIV3) en el que el marco de lectura abierto (ORF) de N fue reemplazado por el de su homólogo BPIV3. El virus quimérico resultante, rHPIV3-N_B, denominado también cKa o cSF, se replicó eficientemente *in vitro* pero fue restringido en la replicación en el tracto respiratorio superior de los monos rhesus, identificando la proteína N como un determinante independiente de la restricción del rango de hospedadores de BPIV3 en los monos rhesus (Bailly *et al.*, J. Virol. 74: 3188-3195, 2000).

55 En el presente ejemplo, se examinó la contribución de los genes de la glucoproteína de fusión (F) y los genes de la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus paragripal bovino tipo 3 (BPIV3) a su replicación restringida en el tracto respiratorio de los primates no humanos generando y caracterizando dos virus BPIV3/HPIV3 quiméricos recíprocos. Un HPIV3 quimérico que contiene genes heterólogos de glucoproteínas F y HN de BPIV3 en lugar de los suyos propios, y el recombinante recíproco que comprende un “esqueleto” de BPIV3 que lleva los genes F y HN de HPIV3 en sustitución de los genes homólogos de glucoproteínas de BPIV3, fueron generados para evaluar el efecto de la sustitución de las glucoproteínas sobre la replicación de HPIV3 y BPIV3 en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos rhesus. Por tanto, en un virus quimérico, los genes F y HN de HPIV3 fueron reemplazados con sus homólogos de BPIV3, produciendo un recombinante quimérico denominado rHPIV3-F_BHN_B. Se construyó el recombinante quimérico recíproco de PIV3 (rBPIV3-F_HHN_H) reemplazando los genes F y HN de un BPIV3 recombinante (rBPIV3) con sus homólogos de HPIV3. En el último virus, la introducción de los ORF de F y HN de HPIV3 en el esqueleto de BPIV3 combina los determinantes antigenicos de HPIV3 con el esqueleto de BPIV3 y proporciona así un mejor candidato para la vacuna en comparación con el BPIV3 parental. Los genes F y HN fueron intercambiados

como pares en vista de los requerimientos propuestos para las proteínas HN y F homólogas para los virus paragripales para una completa actividad funcional (Deng *et al.*, Virology 209: 457-469, 1995; y Tanabayashi *et al.*, J. Virol. 70: 6112-6118, 1996).

- 5 Los virus químéricos mencionados fueron recuperados fácilmente y presentaron cinéticas de replicación en las células LLC-MK2 de simio que fueron comparables a las de sus virus parentales, dando a entender que las glucoproteínas heterólogas eran compatibles con las proteínas internas de PIV3. Las características distintivas de la citopatología de BPIV3 frente a HPIV3 se mantenían aparte junto con sus respectivos genes F y HN. El HPIV3 que lleva los genes F y HN de BPIV3 fue atenuado para la replicación en monos rhesus hasta un nivel similar al de su virus parental BPIV3,
- 10 indicando que los genes de glucoproteína de BPIV3 son determinantes mayores de su restricción de replicación por el rango de hospedadores en los monos rhesus. El BPIV3 que lleva los genes F y HN de HPIV3 (rBPIV3-F_HHN_H) fue replicado en monos rhesus hasta un nivel intermedio entre el de HPIV3 y el de BPIV3.

- 15 Estos resultados indican que los genes F y HN contribuyen significativamente a la atenuación global de BPIV3. Además, demuestran que las secuencias de BPIV3 fuera de la región F y HN también contribuyen al fenotipo de atenuación en los primates. Este último hallazgo es consistente con la demostración en el ejemplo precedente de que la secuencia codificadora de nucleoproteína de BPIV3 es un determinante de su atenuación para los primates. A pesar de su replicación restringida en el tracto respiratorio de monos rhesus, el rBPIV3-F_HHN_H confirió un nivel de protección contra al enfrentamiento con HPIV3 natural que fue indistinguible del conferido por una infección previa 20 con HPIV3 natural. A partir de estos hallazgos y otros relacionados, se ve claramente la utilidad de rBPIV3F_HHN_H como un candidato para la vacuna frente a HPIV3.

Virus y células

- 25 Se mantuvieron cultivos de monocapas de células HEp-2 y LLC-MK2 de simio en medio MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con suero fetal bovino al 5% (Summit Biotechnology, Ft. Collins, CO), 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, y glutamina 4 mM (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

- 30 La cepa Kansas/15626/84 de BPIV3 natural (Clon 5-2-4, Lote BPI3-1) (BPIV3 Ka), el HPIV3 JS natural, su versión recombinante (rHPIV3), y el virus rHPIV3 que contiene el ORF de Ka N de BPIV3 en lugar del ORF N de HPIV3 (rHPIV3-N_B) se han descrito cada uno anteriormente (véase también, Clements *et al.*, 1991, *cita anterior*; Karron *et al.*, 1995a, *cita anterior*; Bailly *et al.*, 2000, *cita anterior*; y Durbin *et al.*, 1997, *cita anterior*). Los PIV fueron propagados a 32°C en células LLC-MK2 (ATCC CCL-7), como se ha descrito previamente (Hall *et al.*, 1992, *cita anterior*). El virus recombinante de la cepa Ankara de vaccinia modificada (MVA) que expresa el bacteriófago T7 35 RNA polimerasa está descrito por Wyatt *et al.* (1995, *cita anterior*).

Construcción de los cDNA antigenómicos que codifican los virus BPIV3/HPIV3 recombinantes

a) *Construcción de cDNA para recuperar rBPIV3*

- 40 Se construyó un cDNA de longitud completa para codificar el RNA antigenómico completo de 15456 nucleótidos (nt) de BPIV3 Ka, como se ha descrito antes. Se ensambló el cDNA procedente de 4 subclones derivados por transcripción inversa (RT) del RNA viral utilizando el sistema SuperScript II Pre-amplification System (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un kit High Fidelity PCR kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Los productos de la RT-PCR fueron clonados en plásmidos pUC19 modificados (New England Biolabs, Beverly, MA) utilizando los siguientes sitios de reconocimiento de la enzima de restricción internos que se presentan en la naturaleza: *Sma*I (posición nt 186 de la secuencia de BPIV3 Ka), *Pst*I (nt 2896), *Mlu*I (nt 6192), *Sac*II (nt 10452) y *Bsp* LU11 (nt 15412). Se secuenciaron múltiples subclones del cDNA antigenómico utilizando un secuenciador Perkin Elmer ABI 310 con dRhodamine Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystems, Warrington, UK), y solamente los que concordaban con la secuencia de consenso de BPIV3 Ka se utilizaron para el ensamblaje del clón de longitud completa. Los extremos 3' y 5' de BPIV3 Ka fueron clonados y el ensamblaje del cDNA de longitud completa tuvo lugar en el vector p(Right) descrito previamente (Durbin *et al.*, 1997, *cita anterior*), que se modificó para contener un nuevo polilíngue con los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción para *Xho*I, *Sma*I, *Mlu*I, *Sac*II, *Eco*RI, *Hind*III y *Rsr*II. El clón de cDNA de longitud completa pBPIV3(184) 45 contenía los siguientes elementos en orden 3' a 5': un promotor T7 seguido por 2 residuos no virales de guanosina, la secuencia antigenómica completa de BPIV3 Ka, una ribozima del virus delta de la hepatitis y un terminador de la transcripción de la T7 polimerasa (Bailly *et al.*, 2000, *cita anterior*; y Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*).

b) *Construcción de rHPIV3-F_BHN_B y rBPIV3-F_HHN_H*

- 60 Se introdujeron sitios únicos de reconocimiento de la enzima de restricción en el cDNA antigenómico de BPIV3 y en el cDNA antigenómico de HPIV3 previamente descrito, p3/7(131)2G (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*) para facilitar el intercambio de los genes F y HN entre los cDNA de BPIV3 y HPIV3. Utilizando el protocolo de mutagénesis transformadora dirigida al sitio de Clontech (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA), se introdujeron sitios de restricción *Sgr*AI en la región no codificadora hacia abajo del gen M en la posición 4811 de la secuencia de rBPIV3 y en la posición 4835 de la secuencia de rHPIV3 JS (GenBank N° de acceso Z11575). El número del nucleótido dado para la posición de los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción indica el nucleótido después del cual corta la enzima, no el primer nucleótido del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. La secuencia se cambió de

ES 2 312 347 T3

TCCAACATTGCA (SEQ. ID. NO. 2) a TCCACCGGTGCA (SEQ. ID. NO. 3) en rBPIV3 y de CGGACGTATCTA (SEQ. ID. NO. 4) a CGCACCGGTGTA (SEQ. ID. NO. 5) en rHPIV3 (los sitios de reconocimiento están subrayados).

Se introdujeron sitios de restricción *Bs*/WI en la región no codificadora hacia abajo del gen HN en el nt 8595 de la secuencia de rBPIV3 y en el nt 8601 de la secuencia de rHPIV3 JS. La secuencia se cambió de GATATAAAGA (SEQ.

5 ID. NO. 6) a GACGTACGGA (SEQ. ID. NO. 7) en rBPIV3 para dar pBPIVs(107) y de GACAAAAGGG (SEQ. ID. NO. 8) a GACGTACGGG (SEQ. ID. NO. 9) en rHPIV3 para dar pHPIVs(106). Los genes F y HN fueron intercambiados entre pBPIVs(107) y pHPIVs(106) mediante digestión de cada uno con *SgrAI* y *Bs*/WI, purificación en gel de los fragmentos, y ensamblaje de los fragmentos apropiados en los dos cDNA de longitud completa. El esqueleto de HPIV3 que lleva los genes F y HN de BPIV3, designado como pHPIV(215), codificaba 15480 nucleótidos (nts) de la

10 secuencia viral, de los cuales los nts 4835 a 8619 venían de BPIV3, y se utilizó para derivar rHPIV3-F_BHN_B (Figuras 8A-8C). El esqueleto de BPIV3 que lleva los genes F y HN de HPIV3, designado como pBPIV(215), codificaba 15438 nts de la secuencia viral, de los cuales los nts 4811 a 8577 venían de HPIV3, y se utilizó para derivar el rBPIV3-F_HHN_H (Figuras 8A-8C).

15 Plásmidos soporte de BPIV3 para la recuperación de virus a partir de cDNA

Los plásmidos soporte que codifican los genes N, P y L de BPIV3 Ka se ensamblaron en vectores pUC19 modificados y después se clonaron en el vector pTM-1 previamente descrito (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*). Con el fin de colocar los genes individuales inmediatamente hacia abajo del promotor T7 en el vector pTM, se introdujo un sitio

20 *NcoI* en el codón de iniciación de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de N, P y L utilizando mutagénesis dirigida al sitio. El sitio de restricción *NcoI* y un sitio de restricción que se presenta naturalmente hacia abajo de cada ORF (*Spe I* para N, *HincII* para P y *Bsp LU11I* para L) se utilizó para la clonación en el pTM. Después de la clonación, el sitio *NcoI* en pTM(N) se mutagenizó volviendo a la secuencia original para restaurar la asignación correcta de aminoácidos en el segundo codón. En los pTM(P) y pTM(L) la secuencia de aminoácidos codificada por el ORF no se alteró por la

25 introducción de los sitios *Nco I*.

Transfección

30 Se cultivaron células HEp-2 (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por pocillo de una placa de seis pocillos) hasta 90% de confluencia y se transfectaron con 0,2 μ g cada una de los plásmidos soporte de BPIV3, pTM(N) y pTM(P), y 0,1 μ g de pTM(L), junto con 5 μ g del cDNA antigenómico de longitud completa y 12 μ l de LipofectACE (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Cada mezcla de transfección contenía también $1,5 \times 10^7$ unidades formadoras de placas (PFU) de MVA-T7, como se ha descrito previamente (Durbin *et al.*, 1997, *cita anterior*). Se incubaron los cultivos a 32°C durante 12 horas antes de que el medio fuera reemplazado con MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) contenido suero fetal bovino al 10%. Se recogieron los sobrenadantes después de incubación a 32°C durante tres días más, y se sometieron a pases sobre monocapas de células LLC-MK2 en frascos de 25 cm² y se incubaron durante 5 días a 32°C. El virus presente en el sobrenadante se purificó en placa tres veces antes de la amplificación y caracterización.

40 Caracterización molecular de los recombinantes químicos recuperados

La presencia de los genes heterólogos F y HN en el esqueleto de PIV3 bovino o humano se confirmó en los virus recombinantes purificados en placa mediante la RT-PCR del RNA viral aislado de las células infectadas o del sobrenadante, que se realizó utilizando un par de cebadores que reconoce las secuencias conservadas en rBPIV3 y rHPIV3. Esto dio fragmentos de tamaño similar (nts 4206-9035 en rBPIV3, nts 4224-9041 en rHPIV3, nts 4206-9017 en rBPIV3-F_HHN_H, y nts 4224-9059 en rHPIV3-F_BHN_B) que después fueron digeridos con *EcoRI* y fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Fig. 9). La secuencia de nucleótidos que flanquea los sitios de restricción *SgrAI* y *Bst*/WI introducidos en cada virus se confirmó secuenciando el producto respectivo de la RT-PCR.

50 Replicación de los virus químicos HPIV3/BPIV3 en cultivo celular

Se determinó la cinética de crecimiento multiciclo de BPIV3 Ka, rHPIV3-F_BHN_B, rBPIV3-F_HHN_H, rHPIV3-N_B y rHPIV3 en células LLC-MK2 infectando las células por triplicado con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 y recogiendo muestras a intervalos de 24 horas a lo largo de un periodo de seis días, como se ha descrito previamente (Tao *et al.*, 1998, *cita anterior*). Se congelaron las muestras rápidamente y se titularon en un único ensayo en monocapas de células LLC-MK2 en placas de 96 pocillos a 32°C, como se ha descrito (Durbin *et al.*, Virology 261: 319-330, 1999b).

60 Estudios en modelo de primates

Se inocularon intranasalmente e intratraquealmente monos Rhesus seronegativos para PIV3 como se determina por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) (van Wyke Coelingh *et al.*, 1988, *cita anterior*) en grupos de 2 o 4 animales con 10^5 dosis₅₀ infecciosas de cultivo de tejido (TCID₅₀) por ml de BPIV3 Ka, rHPIV3-F_BHN_B, rBPIV3-F_HHN_H, rHPIV3-N_B o rHPIV3. Se recogieron frotis nasofaríngeos diariamente los días 1 a 11 y el día 13. Se 65 recogieron muestras de lavado traqueal los días 2, 4, 6, 8, y 10 después de la infección. Se congelaron rápidamente las muestras individuales y se conservaron a -70°C hasta que todas las muestras estuvieron disponibles para titulación. Se tituló el virus en las muestras sobre monocapas de células LLC-MK2 en placas de 24 y 96 pocillos como se ha descrito previamente (Durbin *et al.*, 1999b, *cita anterior*). Los sueros recogidos de los monos los días 0 y 28 fueron analizados

ES 2 312 347 T3

por el ensayo HAI utilizando HPIV3 JS y BPIV3 Ka como antígenos, como se ha descrito previamente (van Wyke Coelingh *et al.*, 1988, *cita anterior*). El día 28 después de la inoculación, se enfrentaron los monos intranasalmente e intratraquealmente con 10^6 TCID₅₀ por sitio de HPIV3 JS. Se recogieron muestras de frotis nasofaríngeo los días 3, 4, 5, 6, 7 y 8, y muestras de lavado traqueal los días 4, 6 y 8 después del enfrentamiento. Se titularon las muestras en un único ensayo como se ha descrito antes. Se recogió el suero el día 28 después del enfrentamiento.

Recuperación de rBPIV3 y los virus químéricos BPIV3/HPIV3 (rHPIV3-F_BHN_B y rBPIV3-F_HHN_H) a partir de cDNA

10 Se construyó un cDNA antigenómico completo de BPIV3, denominado pBPIV(184), para codificar la secuencia de consenso de BPIV3 Ka. Este cDNA antigenómico de BPIV3 se modificó después mediante la introducción de sitios únicos *SgrAI* y *BstWI* en la región no codificadora hacia abajo de los genes M y HN, respectivamente (Fig. 8C). Se introdujeron los mismos sitios de restricción en la región no codificadora hacia abajo de los genes M y HN de un cDNA antigenómico completo de HPIV3 descrito previamente, p3/7(131)2G (Durbin *et al.*, 1997a, *cita anterior*). Los genes 15 de las glucoproteínas F y HN de HPIV3 y BPIV3 fueron intercambiados mediante el cambio de este fragmento de restricción *SgrAI-BstWI*. Se anticipó que un intercambio directo de genes completos sería bien tolerado debido al alto nivel de conservación de la secuencia entre las señales que actúan en *cis* de BPIV3 y HPIV3. El cDNA antigenómico de HPIV3 que lleva los genes F y HN de BPIV3 fue denominado pHPIV(215), y el cDNA antigenómico de BPIV3 que lleva los genes F y HN de HPIV3 fue denominado pBPIV(215).

20 Los cDNA antigenómicos pBPIV(184), pHPIV(215), pBPIV(215) y p3/7(131)2G fueron transfectados por separado a células HEp-2 junto con los tres plásmidos soporte de BPIV3 pTM(N), pTM(P) y pTM(L), y las células fueron infectadas simultáneamente con MVA recombinante que expresa la T7 RNA polimerasa. Para confirmar que los virus recuperados eran ciertamente los virus esperados rBPIV3, rHPIV3-F_BHN_B, rBPIV3-F_HHN_H y rHPIV3, se analizó el 25 RNA intracelular o el RNA procedente del sobrenadante de cada virus clonado, por la RT-PCR utilizando un par de cebadores que reconocía las secuencias idénticas en HPIV3 JS y BPIV3 Ka. El par cebador amplificó un fragmento de 4,8 kb de DNA correspondiente al extremo hacia abajo del gen M, de los genes F y HN, y el extremo hacia arriba del gen L (nts 4206-9035 en rBPIV3, nts 4224-9041 en rHPIV3, nts 4206-9017 en rBPIV3-F_HHN_H, y nts 4224-9059 en rHPIV3-F_BHN_B). La generación de cada producto de la PCR fue dependiente de la inclusión de transcriptasa reversa, 30 indicando que cada uno era derivado del RNA viral y no del cDNA contaminante (no se muestran datos). Los productos de la PCR fueron digeridos entonces con *EcoRI*, lo que se podría predecir que daría un modelo de digestión por la enzima de restricción único, diferente, para cada uno de los cuatro virus (Fig. 9). En cada caso, se observó el modelo previsto, confirmando la identidad del esqueleto y de los genes F y HN insertados. Además, se realizó la secuenciación de nucleótidos sobre los productos de la RT-PCR para confirmar la presencia de los sitios de restricción introducidos 35 y de las secuencias flanqueantes.

El efecto citopático (CPE) causado por rBPIV3-F_HHN_H en las células LLC-MK2 fue indistinguible del de HPIV3 JS (células condensadas, redondeadas y pequeños sincitios) pero diferente de BPIV3 (sincitios multicelulares grandes), mientras que el CPE causado por rHPIV3-F_BHN_B fue idéntico al causado por BPIV3. Esto indica que la citopatología 40 de los PIV químéricos se mantenía aparte junto con el origen parental de los genes F y HN.

Los virus químéricos BPIV3/HPIV3 se replican eficientemente en cultivo celular

45 La cinética de crecimiento de rHPIV3-F_BHN_B y rBPIV3-F_HHN_H se comparó con la de sus virus parentales infectando monocapas de LLC-MK2 a una MOI de 0,01 y monitorizando la producción de virus infeccioso. La cinética y la magnitud de replicación de los dos virus químéricos fueron comparables a las de sus virus parentales HPIV3 o BPIV3 (Fig. 10). Esto sugiere que las glucoproteínas de BPIV3 y HPIV3 eran compatibles con las proteínas internas heterólogas de PIV3. Esta es una importante propiedad porque hará posible preparar eficientemente virus para vacuna.

50

Los genes F y HN de los virus químéricos BPIV3/HPIV3 son determinantes de la restricción de la replicación por el rango de hospedadores de BPIV3 Ka en el tracto respiratorio de monos Rhesus

55 Se evaluaron rHPIV3-F_BHN_B y rBPIV3-F_HHN_H en cuanto a su capacidad para replicarse en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos rhesus. En particular, se demostraron los efectos de la introducción de los genes F y HN de BPIV3 en el HPIV3 sobre la atenuación de la replicación en monos rhesus, como se ha descrito antes para la proteína N de BPIV3 (véase también, Baily *et al.*, 2000, *cita anterior*). Además, se determinaron los efectos de la introducción de los genes F y HN de HPIV3 en el BPIV3 sobre la replicación en monos rhesus. Si las mutaciones 60 atenuantes predominantes de BPIV3 estuvieran en otros genes distintos de F y HN, se podría esperar entonces un pequeño efecto global del intercambio de glucoproteínas de HPIV3-BPIV3 sobre la replicación de BPIV3 en los monos rhesus.

65 Se administró cada virus químérico intranasalmente e intratraquealmente a monos rhesus en una dosis de 10^5 TCID₅₀ por sitio. El nivel de replicación de los virus químéricos se comparó con el de los virus parentales rHPIV3 y BPIV3 y con el de rHPIV3-N_B (Tabla 3). Puesto que el virus parental rHPIV3 se replicó a un nivel de bajo a moderado en el tracto respiratorio inferior, sólo se podrían hacer comparaciones significativas entre grupos para la replicación en el tracto respiratorio superior. El nivel de replicación de rHPIV3-F_BHN_B fue similar al de su BPIV3

ES 2 312 347 T3

parental y sustancialmente inferior al de su HPIV3 parental (Tabla 3; Figura 11, panel A). Esto demostró que los genes de las glucoproteínas de BPIV3 contenían uno o más determinantes mayores del fenotipo de atenuación del rango de hospedadores de BPIV3 para los monos rhesus. La magnitud y modelo de replicación de rHPIV3-F_BHN_B y rHPIV3-N_B fueron muy similares, indicando que cada uno de los dos elementos genéticos bovinos, especialmente el gen N frente a los genes F y HN, atenúan el HPIV3 en una medida similar.

TABLA 3

10 *Los genes de las glucoproteínas F y HN de BPIV3 contribuyen a su replicación restringida en el tracto respiratorio de monos rhesus*

15	Virus inmunizante ¹	Número de animales ²	Media de picos del título del virus ³ (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml ± S.E.) [Grupo Duncan] ⁴		Título de anticuerpos HAI séricos (media recip. log ₂ ± S.E.) para HPIV3 el día 28 ⁷	Título de anticuerpos HAI séricos (media recip. log ₂ ± S.E.) para BPIV3 el día 28 ⁷
			Frotis NP ⁵	Lavado traqueal ⁶		
20	rHPIV3	6	4,7 ± 0,54 [A]	2,4 ± 0,37 [A]	9,5 ± 0,72 [A]	6,8 ± 1,03 [B]
	rBPIV3-F _H HN _H	4	3,1 ± 0,58 [B]	1,6 ± 0,05 [A]	6,8 ± 0,63 [BC]	3,8 ± 0,63 [C]
25	rHPIV3-N _B	6	3,0 ± 0,60 [B]	1,4 ± 0,19 [A]	8,2 ± 0,48 [AB]	6,5 ± 0,62 [B]
	rHPIV3-F _B HN _B	4	2,9 ± 0,28 [B]	2,0 ± 0,24 [A]	4,5 ± 0,29 [D]	9,5 ± 0,65 [A]
	BPIV3 Ka	6	2,6 ± 0,26 [B]	1,6 ± 0,10 [A]	5,5 ± 0,62 [CD]	9,2 ± 0,60 [A]

¹ Los monos fueron inoculados intranasalmente e intratraquealmente con 10⁵ TCID₅₀ de virus en un inóculo de 1 ml en cada sitio.

² Los grupos con 6 animales contenían 4 animales cada uno procedentes de un previo estudio en rhesus (Bailly *et al.*, 2000, *cita anterior*).

³ Media de los picos del título de virus de cada animal en su grupo independientemente del día de muestreo. S.E. = error estándar.

⁴ Las titulaciones de virus se realizaron en células LLC-MK2 a 32 °C. El límite de detectabilidad del título de virus fue 10 TCID₅₀/ml. Las medias de los títulos virales se compararon utilizando un test de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Dentro de cada columna, las medias de los títulos con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Los títulos indicados con dos letras no son significativamente diferentes de los indicados con cualquiera de las letras.

⁵ Las muestras de frotis nasofaringeo se recogieron los días 1 a 11 y el día 13.

⁶ Las muestras de lavado traqueal se recogieron los días 2, 4, 6, 8 y 10 post-infección.

⁷ Los títulos el día 0 fueron <2,0. El día 28 fue el día de enfrentamiento con HPIV3 natural.

^{**}Dos de los animales en el grupo rHPIV3 fueron infectados con rHPIV3s, conteniendo el virus dos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción para el intercambio de glucoproteína.

El virus químérico rBPIV3-F_HHN_H se replicó significativamente menos que el rHPIV3 (Tabla 3), y se agrupó con BPIV3 en un test de rango múltiple de Duncan. Sin embargo, la inspección de su modelo de replicación en la Figura 11B sugirió que el rBPIV3-F_HHN_H se replicaba a un nivel intermedio entre los de sus HPIV3 y BPIV3 parentales. La interpretación de que rBPIV3-F_HHN_H se replica a un nivel intermedio entre los de sus parentales es apoyada por el test de Friedman de consistencia de rangos (Sprent, P., "A Generalization Of The Sign Test," Applied Nonparametric Statistical Method, pp. 123-126, Chapman and Hall, London, 1989), que indicó que los títulos medios de HPIV3, rBPIV3-F_HHN_H y BPIV3 entre el día 3 y el día 8 después de la infección son significativamente diferentes (d.f. 2,8; $p<0,05$). La observación de que la introducción de las proteínas F y HN de HPIV3 produjo un aumento en la replicación de BPIV3 en monos rhesus indica (i) que F y HN contienen uno o más determinantes de restricción del rango de hospedadores y (ii) que uno o más elementos genéticos de BPIV3 que están fuera de los genes F y HN, por ejemplo la proteína N, atenúan el virus para los monos rhesus. Esto confirma que la base genética para la restricción del rango de hospedadores puede implicar múltiples genes.

55 *El BPIV3 químérico que lleva genes de las glucoproteínas de HPIV3 induce el anticuerpo sérico HAI frente a HPIV3 y un alto nivel de resistencia al enfrentamiento con HPIV3 natural (wt)*

60 El rBPIV3-F_HHN_H tiene importantes características que le convierten en un candidato para vacuna de virus vivos atenuados frente a HPIV3, que incluyen los genes atenuantes de BPIV3 y la especificidad antigenética de HPIV3, esto es las glucoproteínas F y HN, que son los antígenos protectores mayores. Por tanto, fueron documentadas su inmunogenicidad y su eficacia protectora frente al enfrentamiento con HPIV3. Se inmunizaron monos Rhesus por infección con BPIV3 Ka, rHPIV3-F_BHN_B, rBPIV3-F_HHN_H, rHPIV3-N_B, o rHPIV3. Se enfrentaron 28 días más tarde con virus HPIV3 JS natural. Se tomaron muestras de suero antes de la infección inicial el día 0 y antes del enfrentamiento. El BPIV3 y el rHPIV3-F_BHN_B indujeron anticuerpos HAI séricos que reaccionaron más eficazmente con BPIV3 que con HPIV3, mientras que fue el caso contrario para el HPIV3 y el rBPIV3-F_HHN_H. Así, el origen de los genes de las glucoproteínas en cada virus determinó si la respuesta del anticuerpo HAI estaba dirigida predominantemente frente a

ES 2 312 347 T3

HPIV3 o frente a BPIV3. La replicación del virus de enfrentamiento HPIV3 se redujo significativamente en el tracto respiratorio superior e inferior de los monos inmunizados previamente (Tabla 4). Aunque el nivel de eficacia protectora frente a HPIV3 no fue significativamente diferente entre los diferentes virus, los virus que llevan F y HN de HPIV3 fueron consistentemente más protectores en el tracto respiratorio superior que los virus que llevan F y HN de BPIV3.

5 Esto está de acuerdo con el más alto nivel de anticuerpos HAI séricos específicos de HPIV3 inducidos por los virus que llevan F y HN de HPIV3.

TABLA 4

10 *La inmunización de monos rhesus con virus BPIV3/HPIV3 químérico recombinante induce la resistencia para el enfrentamiento con HPIV3 natural*

15	Virus inmuni-zante ¹	Número de animales ²	Media de picos del título del virus ³ (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml ± S.E.) [Grupo Duncan] ⁴		Título de anticuer-pos HAI séricos (media recip. log ₂ ± S.E.) para HPIV3 el día del enfrenta-miento	Título de anticuer-pos HAI séricos (media recip. log ₂ ± S.E.) para BPIV3 28 días después del enfrentamiento
			1 Frotis nasofarín-geo ⁵	Lavado traqueal ⁶		
20	ninguno	4	4,5 ± 0,33 [A]	4,5 ± 0,19 [A]	<2	12,0 ± 0,58 [A]
	rHPIV3	6	2,3 ± 0,14 [B]	1,2 ± 0,20 [B]	9,5 ± 0,72 [A]	11,7 ± 0,21 [A]
25	rBPIV3-F _H HN _H	4	2,5 ± 0,25 [B]	1,0 ± 0,48 [B]	6,8 ± 0,63 [BC]	10,5 ± 0,29 [AB]
	rHPIV3-N _B	6	2,3 ± 0,41 [B]	1,4 ± 0,08 [B]	8,2 ± 0,48 [AB]	11,5 ± 0,22 [A]
	rHPIV3-F _B HN _B	4	3,0 ± 0,14 [B]	1,0 ± 0,0 [B]	4,5 ± 0,29 [D]	9,5 ± 0,87 [B]
	BPIV3 Ka	6	2,9 ± 0,26 [B]	1,3 ± 0,20 [B]	5,5 ± 0,62 [CD]	9,3 ± 0,76 [B]

1 Cada mono previamente inmunizado y los controles no inmunizados se enfrentaron con 10⁵ TCID₅₀ de HPIV3 JS en un inóculo de 1 ml en cada sitio 28 días después de la inmunización.

2 Los grupos con 6 animales contenían 4 animales cada uno procedentes de un previo estudio en rhesus (Bailly *et al.*, 2000, *cita anterior*).

3 Media de los picos del título de virus de cada animal en su grupo independientemente del día de muestreo.

4 Las titulaciones de virus se realizaron en células LLC-MK2. El límite de detectabilidad del título de virus fue 10 TCID₅₀/ml. Las medias de los títulos virales se compararon utilizando un test de rango múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$). Dentro de cada columna, las medias de los títulos con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Los títulos indicados con dos letras no son significativamente diferentes de los indicados con cualquiera de las letras. El grupo de animales inmunizados no fue incluido en el análisis de Duncan el día del enfrentamiento.

5 Las muestras de frotis nasofaringeo se recogieron los días 3 a 8 después del enfrentamiento.

6 Las muestras de lavado traqueal se recogieron los días 4, 6, y 8 después del enfrentamiento.

**Dos animales en el grupo rHPIV3 fueron infectados con rHPIV3s.

45 Basándose en los ejemplos mencionados, la invención proporciona la importación de genes de BPIV al esqueleto de un HPIV virulento para dar nuevos PIV químéricos humano-bovinos, candidatos para vacuna. En los recombinantes químéricos descritos en el presente ejemplo, el rHPIV3-F_BHN_B se replicó *in vitro* así como los respectivos virus parentales. Se confirmó también que el intercambio de F y HN entre el BPIV3 y el HPIV3 es compatible dado que las proteínas F y HN de HPIV1 considerablemente más divergentes eran altamente funcionales en un fondo de HPIV3 (Tao *et al.*, J. Virol. 72: 2955-2961, 1998), lo que se puso de manifiesto por la capacidad no disminuida de los virus químéricos para la replicación *in vitro*. El rBPIV3-F_HHN_H se replicó en el tracto respiratorio superior de los monos rhesus hasta un nivel intermedio entre los de sus HPIV3 y BPIV3 parentales indicando que los genes F y HN de BPIV3 contribuyen de manera independiente a la atenuación global de BPIV3 para los primates. La atenuación global de virus BPIV3 es por tanto la suma de dos o más elementos genéticos, uno de los cuales es el conjunto de los genes F y HN y uno de los otros se demuestra que es N.

55 55 Aunque el propio BPIV3 está siendo evaluado como un virus vacunal frente a HPIV3 (Karron *et al.*, Pediatr. Infect. Dis. J. 15: 650-654, 1996; y Karron *et al.*, J. Infect. Dis. 171: 1107-1114, 1995), está solamente relacionado antigenicamente en un 25% con el HPIV3 (Coelingh *et al.*, J. Infect. Dis. 157: 655-662, 1988). Así, la inmunogenicidad de BPIV3 frente a HPIV3 se mejorará si se modifica para expresar los antígenos protectores F y HN de HPIV3. El rBPIV3-F_HHN_H representa un virus de este tipo, y, en el presente ejemplo, la inmunización de monos rhesus con rBPIV3-F_HHN_H indujo un nivel más alto de anticuerpos frente a HPIV3 que la inmunización con BPIV3. Además, el rBPIV3-F_HHN_H confirió un nivel de protección frente a la replicación en el enfrentamiento con HPIV3 en el tracto respiratorio superior e inferior que fue estadísticamente indistinguible de la protección conferida por una infección previa con rHPIV3. Similarmente, el rHPIV3-N_B, que está atenuado por la proteína N de BPIV3 pero tiene antígenos protectores de HPIV3, indujo también un alto nivel de resistencia al enfrentamiento con HPIV3. A pesar de replicarse a niveles similares en los monos rhesus, el rHPIV3-N_B indujo niveles más altos de anticuerpos frente a HPIV3 que el rBPIV3-F_HHN_H.

ES 2 312 347 T3

El rBPIV3-F_HHN_H se replica a niveles más altos en los monos rhesus que el BPIV3, aunque está significativamente atenuado en comparación con el HPIV3. Puesto que el nivel de replicación de BPIV3 en los seres humanos es bajo (Karron *et al.*, J. Infect. Dis. 171: 1107-1114, 1995), se espera que este aumento sea bien tolerado entre los vacunados. Alternativamente, se describen aquí métodos adicionales para atenuar los virus quiméricos humano-bovinos para 5 asegurar que los virus de la vacuna replicados sólo hasta niveles moderados, por ejemplo en lactantes humanos, para prevenir enfermedades del tracto respiratorio inaceptables entre los vacunados.

El ligero aumento en la replicación de rBPIV3-F_HHN_H en los primates ofrece una oportunidad para utilizar el rBPIV3-F_HHN_H como un vector para antígenos virales heterólogos tales como las glucoproteínas de otros PIVs (por 10 ejemplo, HPIV1 y HPIV2), las glucoproteínas F y G de RSV, y la glucoproteína HA del sarampión, que pueden ser incorporadas como genes o segmentos genómicos añadidos o sustituidos en el HPIV3 atenuado candidato para la vacuna. En diferentes ejemplos descritos aquí, el ligero aumento en la replicación de rBPIV3-F_HHN_H en los monos sobre el de BPIV3 puede ser compensado por la adición de antígenos virales protectores extraños, por ejemplo, glucoproteínas 15 de RSV, cuya adición proporciona un nivel seleccionado de atenuación. Los datos presentados aquí definen además la base para la restricción del rango de hospedadores de BPIV3 para los primates e identifican el rBPIV3-F_HHN_H como un candidato potencial para la vacuna frente a HPIV3 y como un vector para antígenos virales heterólogos.

Información sobre el depósito de microorganismos

20 Los siguientes materiales han sido depositados ante la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, cumpliendo las condiciones del Tratado de Budapest, y han sido designados como sigue:

25

	Plásmido	Nº de acceso	Fecha de depósito
30	p3/7(131)	(ATCC 97990)	18 abril, 1997
	p3/7(131)2G	(ATCC 97989)	18 abril, 1997
	P218(131)	(ATCC 97991)	18 abril, 1997

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende un genoma o antigenoma del virus paragripal (PIV) quimérico, que incluye un genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo de un PIV humano combinado con uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos de uno o más PIV diferentes, para formar un genoma o antigenoma de PIV quimérico humano-bovino, en el que al menos uno de los genes o segmentos genómicos heterólogos codifica una proteína mayor de la nucleocápsida (N) de PIV bovino.
- 10 2. Un virus paragripal quimérico humano-bovino infeccioso (PIV), que comprende una proteína mayor de la nucleocápsida (N), una fosfoproteína de la nucleocápsida (P), una proteína polimerasa de gran dimensión (L) y un genoma o antigenoma quimérico humano-bovino codificado por el polinucleótido de la reivindicación 1.
- 15 3. Un PIV quimérico según la reivindicación 2, que comprende además uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos adicionales que codifican una o más proteínas P, C, D, V, M, F, HN y/o L de PIV o fragmentos de las mismas.
- 20 4. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que dichos uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos incluyen un marco de lectura abierto completo (ORF) de una o más proteínas P, C, D, V, M, F, HN y/o L de PIV.
- 25 5. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dichos uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos incluyen un elemento regulador heterólogo que comprende una región extrágénica de cabeza 3' o de cola 5', una señal de partida del gen, una señal de final del gen, un sitio de edición de RNA, una señal de encapsidación, una región intergénica o una región no codificadora en 3' o 5'.
- 30 6. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que un gen o segmento genómico heterólogo, o bien sustituye a un gen o segmento genómico homólogo en un genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo;
- 35 se añade de forma adyacente a una región o dentro de una región no codificadora del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo;
- se añade o sustituye en una posición correspondiente a una posición de orden del gen natural, de un gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo; o bien
- se añade o sustituye en una posición que está más próxima al promotor o más distante del promotor en comparación con una posición de orden del gen natural, de un gen o segmento genómico homólogo dentro del genoma o antigenoma de fondo de PIV parcial o completo.
- 40 7. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho genoma o antigenoma quimérico codifica una glucoproteína químérica.
- 45 8. Un PIV quimérico según la reivindicación 2, en el que el genoma o antigenoma de PIV quimérico humano-bovino codifica una glucoproteína químérica que tiene un ectodominio de glucoproteína de HPIV, un determinante antigénico o un epítopo inmunógeno.
9. Un PIV quimérico según la reivindicación 8, en el que el segmento genómico heterólogo codifica un ectodominio de glucoproteína.
- 50 10. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el genoma o antigenoma quimérico se modifica además por adición o sustitución de uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos adicionales procedentes de un PIV humano dentro del genoma o antigenoma quimérico, para aumentar la estabilidad genética o alterar la atenuación, la reactogenicidad o el crecimiento en el cultivo del virus quimérico.
- 55 11. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el genoma o antigenoma quimérico se modifica además por introducción de una o más mutaciones atenuantes identificadas en un PIV mutante de origen biológico u otro virus mutante no segmentado, con RNA de cadena negativa.
- 60 12. Un PIV quimérico según la reivindicación 11, en el que las mutaciones atenuantes, una o más, se estabilizan mediante cambios múltiples de nucleótidos en un codón que especifica la mutación.
- 65 13. Un PIV quimérico según la reivindicación 11, en el que el genoma o antigenoma incorpora al menos una y hasta un complemento entero de mutaciones atenuantes que especifican una sustitución de aminoácido en la proteína L en una posición correspondiente a Tyr 942, Leu 992, o Thr 1558 de JS; en la proteína N en una posición correspondiente a los residuos Val 96 o Ser 389 de JS; en la proteína C, en una posición correspondiente a Ile 96 de JS; en la proteína M, en una posición correspondiente a Pro 199 de JS; en la proteína F, en una posición correspondiente a los residuos Ile 420 o Ala 450 de JS; en la proteína HN, en una posición correspondiente al residuo Val 384 de JS; una sustitución de

ES 2 312 347 T3

nucleótido en una secuencia líder en 3' del virus quimérico en una posición correspondiente al nucleótido 23, 24, 28, o 45 de JS cp45; y/o una mutación en una secuencia de partida del gen N en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS cp45.

5 14. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que una mutación atenuante adicional altera uno o más de los genes N, P, C, D, V, M, F, HN y/o L de PIV y/o una región de cabeza en 3', de cola en 5', un sitio de edición de RNA, una señal de encapsidación y/o una región intergénica.

10 15. Un PIV quimérico según la reivindicación 14, en el que uno o más genes del genoma o antigenoma quimérico se delecionan en su totalidad o en parte o la expresión de los genes se reduce o se elimina por una mutación en un sitio de edición de RNA, por una mutación por desplazamiento del marco de lectura, por una mutación que altera un aminoácido especificado por un codón de iniciación, o por introducción de uno o más codones de terminación en un marco de lectura abierto (ORF) del gen.

15 16. Un PIV quimérico según la reivindicación 15, en el que se introduce una modificación en el genoma o antigenoma quimérico que comprende una delección parcial o completa de uno o más ORF de C, D y/o V o uno o más cambios de nucleótidos, que reduce o elimina la expresión de dichos uno o más ORF de C, D y/o V.

20 17. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en el que el genoma o antigenoma quimérico se modifica para codificar una molécula no PIV seleccionada entre una citocina, un epítopo ayudador de los linfocitos T, un marcador de sitio de restricción, o una proteína de un patógeno microbiano capaz de provocar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero hospedador.

25 18. Un PIV quimérico según la reivindicación 2, en el que el genoma o antigenoma quimérico comprende además uno o más genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican uno o más determinantes antigenéticos de uno o más patógenos heterólogos no PIV.

30 19. Un PIV quimérico según la reivindicación 2, en el que el genoma o antigenoma de fondo es un genoma o antigenoma de HPIV3 parcial o completo y los genes o segmentos genómicos heterólogos que codifican los determinantes antigenéticos son de uno o más HPIVs heterólogos.

35 20. Un PIV quimérico según la reivindicación 18, en el que el patógeno heterólogo se selecciona entre el virus del sarampión, los virus sincitiales respiratorios subgrupo A y subgrupo B, el virus de la parotiditis, los virus del papiloma humano, los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2, los virus del herpes simple, el citomegalovirus, el virus de la rabia, el virus de Epstein Barr, los filovirus, los buniavirus, los flavivirus, los alfavirus y los virus de la gripe.

40 21. Un PIV quimérico según la reivindicación 19, en el que uno o más determinantes antigenéticos se seleccionan de los genes o segmentos genómicos de HPIV1 o HPIV2 que codifican una o más glucoproteínas HN y/o F o dominios antigenéticos, fragmentos o epítropos de las mismas y se añaden o se incorporan dentro del genoma o antigenoma de fondo de HPIV3 parcial o completo.

45 22. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que ambos genes de HPIV1 que codifican las glucoproteínas HN y F, sustituyen a los genes homólogos HN y F de HPIV3 en un genoma o antigenoma de fondo de HPIV3 para formar un genoma o antigenoma de HPIV3-1 quimérico que se modifica después por adición o incorporación de uno o más genes o segmentos genómicos que codifican uno o más determinantes antigenéticos de HPIV2.

50 23. Un PIV quimérico según la reivindicación 22, en el que se añade al genoma o antigenoma quimérico una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HN o F de HPIV2.

55 24. Un PIV quimérico según la reivindicación 20, en el que dichos uno o más determinantes antigenéticos heterólogos se seleccionan entre las proteínas HA y F del virus del sarampión, las proteínas F, G, SH y M2 del virus sincitial respiratorio subgrupo A o subgrupo B, las proteínas HN y F del virus de la parotiditis, la proteína L1 del virus del papiloma humano, la proteína gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 o tipo 2, las proteínas gB, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, y gM del virus del herpes simple y citomegalovirus, la proteína G del virus de la rabia, la proteína gp350 del virus de Epstein Barr, la proteína G de filovirus, la proteína G de buniavirus, las proteínas E y NS1 de flavivirus y la proteína E de alfavirus, y los dominios antigenéticos, fragmentos y epítropos de las mismas.

60 25. Un PIV quimérico según la reivindicación 24, en el que el patógeno heterólogo es el virus del sarampión, y el determinante o determinantes antigenéticos heterólogos se seleccionan entre las proteínas HA y F del virus del sarampión, y los dominios antigenéticos, fragmentos y epítropos de las mismas.

65 26. Un PIV quimérico según la reivindicación 25, en el que una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HA del virus del sarampión, se añade a un genoma o antigenoma quimérico que comprende un genoma o antigenoma de fondo de HPIV3.

ES 2 312 347 T3

27. Un PIV quimérico según la reivindicación 26, que incorpora un gen o segmento genómico procedente del virus sincitial respiratorio (RSV).
- 5 28. Un PIV quimérico según la reivindicación 27, en el que el gen o segmento genómico procedente del RSV codifica una glucoproteína F y/o G de RSV o dominios inmunógenos o epítopos de la misma.
29. Un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 28, que es un virus o una partícula subviral.
- 10 30. Un PIV quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 29, en el que uno o más genes de las glucoproteínas HN y/o F de HPIV están sustituidos por sus genes homólogos de las glucoproteínas HN y/o F de BPIV en el genoma o antigenoma quimérico.
- 15 31. Una composición inmunógena para provocar una respuesta inmunitaria frente a PIV que comprende una cantidad inmunogénicamente suficiente del PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 30, en un vehículo fisiológicamente aceptable.
32. Una composición inmunógena según la reivindicación 31, formulada en una dosis de 10^3 a 10^7 PFU.
- 20 33. Una composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 31 o 32, formulada para administración al tracto respiratorio superior por pulverización, gotitas o aerosol.
34. Una composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en la que el PIV quimérico provoca una respuesta inmunitaria frente a uno o más virus seleccionados entre HPIV1, HPIV2 y HPIV3.
- 25 35. Una composición inmunógena según la reivindicación 34, en la que el PIV quimérico provoca una respuesta inmunitaria frente a HPIV3 y otro virus seleccionado entre HPIV1 y HPIV2.
- 30 36. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende un polinucleótido que codifica un genoma o antigenoma de un PIV quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 30.
37. Un método para producir una partícula de PIV químérica atenuada infecciosa a partir de una o más moléculas de polinucleótido aisladas que codifican dicho PIV, que comprende:
la expresión en un lisado celular o libre de células de un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 36 y las proteínas N, P, y L de PIV.
38. Un método según la reivindicación 37, en el que el genoma o antigenoma de PIV quimérico y las proteínas N, P, y L son expresados por dos o más vectores de expresión diferentes.
- 40 39. Un vector de expresión que comprende un promotor de transcripción ligado de forma funcional, una secuencia de polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 36 y un terminador de transcripción.

45

50

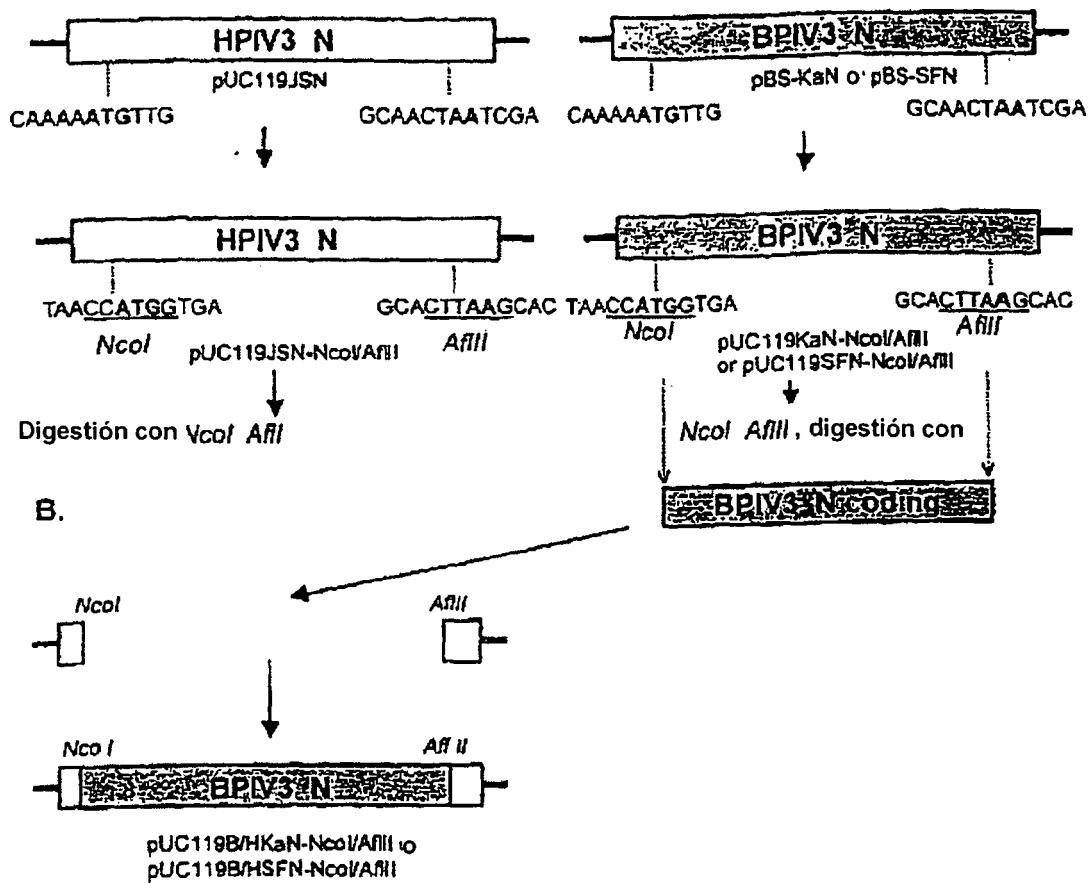
55

60

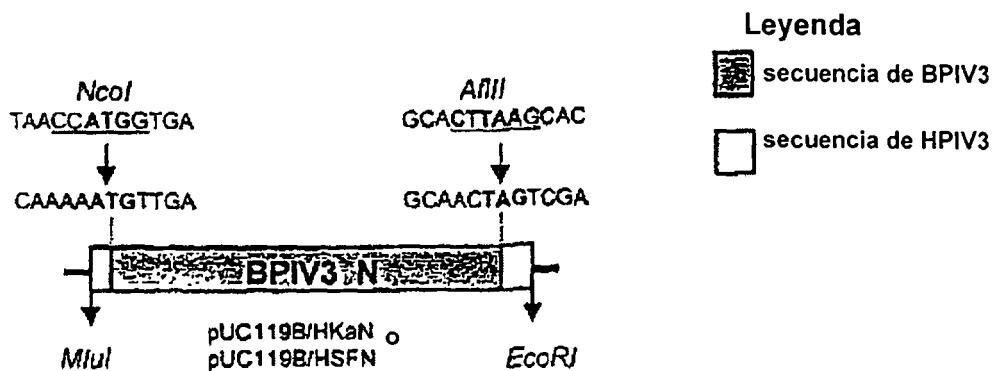
65

Figura 1. Clonación de la región codificadora (N) de las cepas Ka o SF de BPIV3, en el contexto de HPIV3

A. Mutagénesis para crear sitios de restricción en los codones de iniciación y terminación de N



C. Mutagénesis para restablecer el contexto del codón de iniciación y terminación



Leyenda

- secuencia de BPIV3
- secuencia de HPIV3

Figura 2. Clonación de la región codificadora (N) de BPIV3, en el cDNA antigenómico de HPIV3

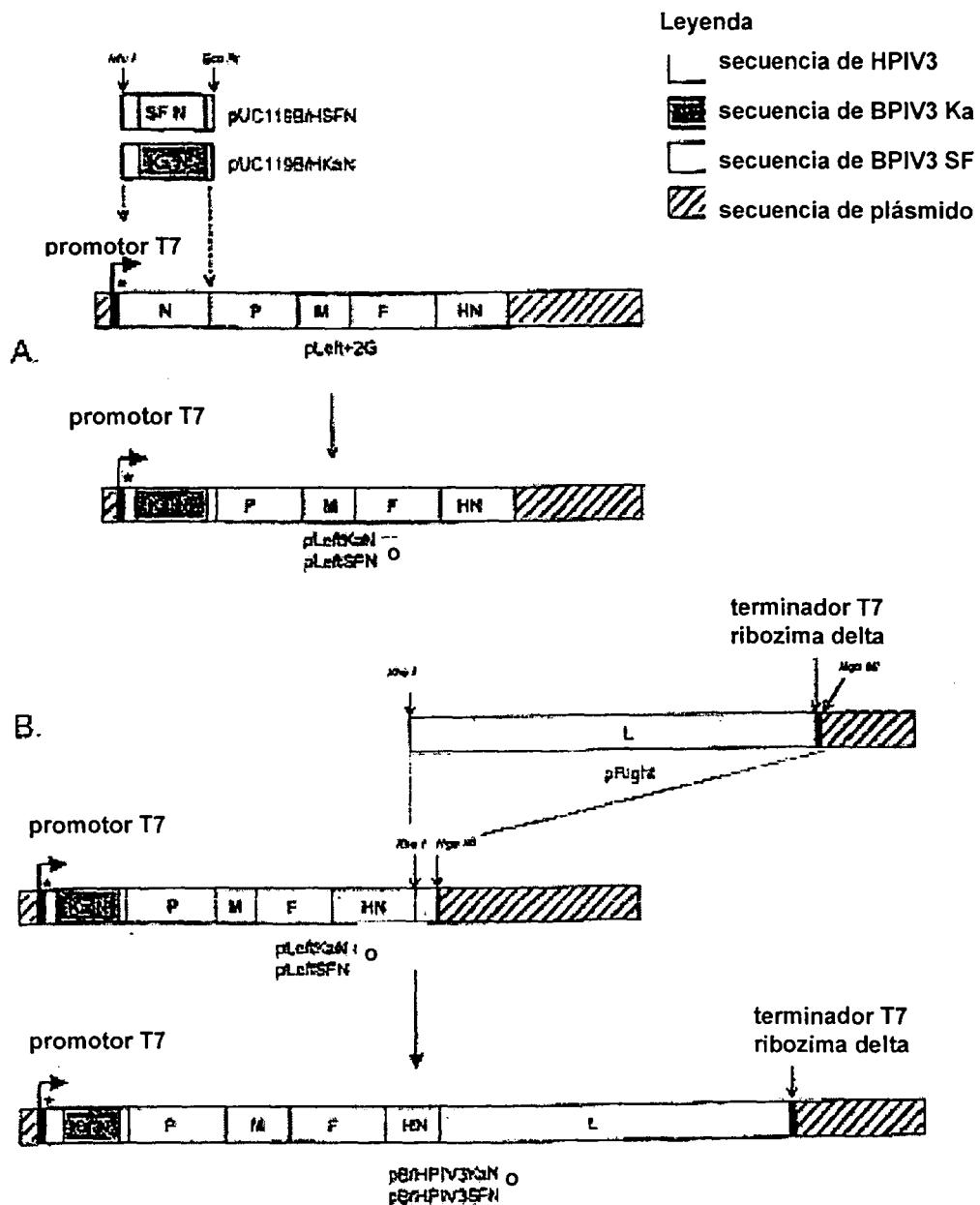


Figura 3. Secuencias de nucleótidos de HPIV3, BPIV3 y virus quiméricos alrededor de los codones de iniciación (A) y de terminación (B) del gen N

A.	rJS	GGA <u>ACTCTATAATTCAA</u> AAAT <u>GTTGAGCTT</u> GAGCCTATTGATA <u>C</u>
	cKa	GGAA <u>CTCTATAATTCAA</u> AAAT <u>GTTGAGCTT</u> GAGCCTATTGACAC
	cSF	GGAA <u>CTCTATAATTCAA</u> AAAT <u>GTTGAGCTT</u> GAGCCTATTGACAC
	Ka	GAA <u>ATCCCTAAGACTGTAATCA</u> T <u>GTTGAGCTT</u> GAGCCTATTGACAC
	SF	GAA <u>ATCCCTAAGACTGTAATCA</u> T <u>GTTGAGCTT</u> GAGCCTATTGACAC
B.	rJS	TTAACGGCATTGGAAAGCA <u>ACTAA</u> AT <u>CGGAATCAACATTTAA</u>
	cKa	TCAGTGCA <u>TTGGAAAGCA</u> ACT <u>AGTCCGAA</u> ATCAACATTTAA
	cSF	TCAGTGCA <u>TTGGAAAGCA</u> ACT <u>AGTCCGAA</u> ATCAACATTTAA
	Ka	TCAGTGCA <u>TTGGAAAGCA</u> ACT <u>AGTCA</u> ACAAAGAGATGACCA
	SF	TCAGTGCA <u>TTGGAAAGCA</u> ACT <u>AGTCA</u> ACAAAGAGATGACCA

ES 2 312 347 T3

Figura 4. Confirmación de la identidad de quimeras potenciales de HPIV3/BPIV3 mediante digestión con *TaqI*

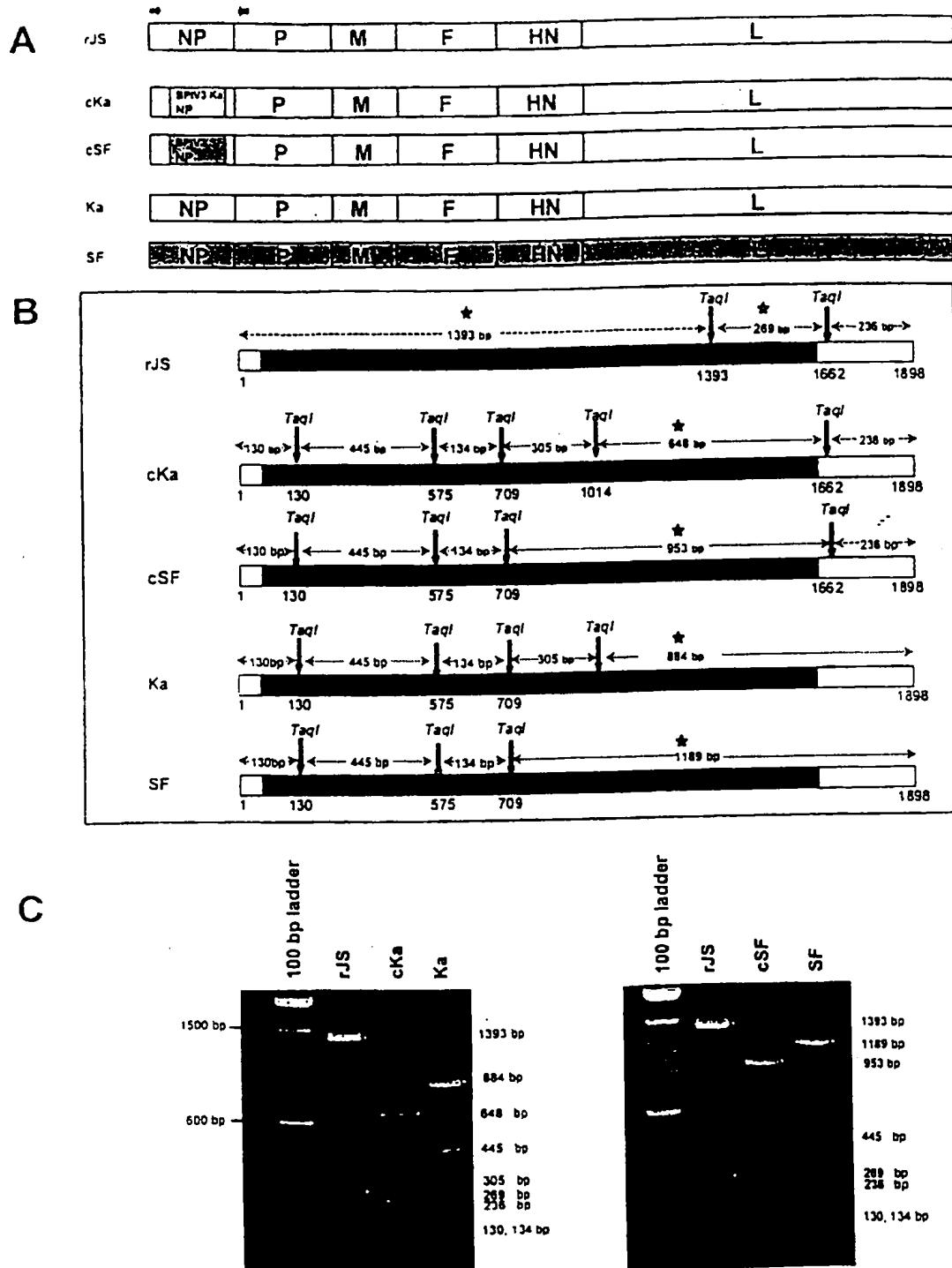
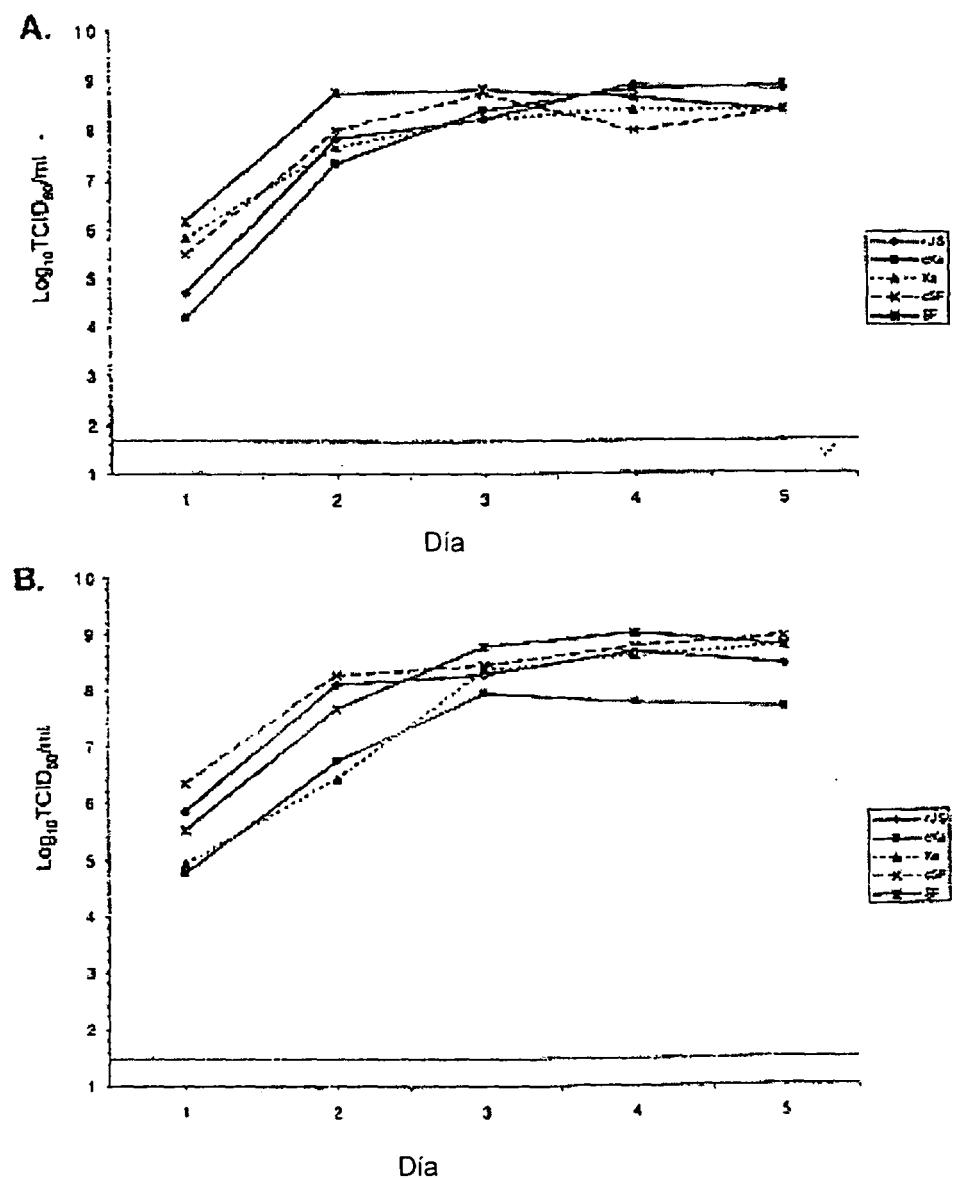


Figura 5. Curvas de crecimiento multiciclo en células MDBK (A) o en células LLC-MK2 (B)



ES 2 312 347 T3

ACCAAAACAAG	AGAAGAGACT	TGCTTGGAA	TATTAATTCA	AATAAAAATT	50
AACTTAGGAT	TAAAGAACTT	TACCGAAAGG	TAAGGGGAAA	GAAATCCTAA	100
GACTGTAATC	ATGTTGAGTC	TATTCGACAC	ATTCA GTGCG	CGTAGGCAGG	150
AGAACATAAC	GAAATCAGCT	GGTGGGGCTG	TTATTCCCGG	GCAAAAAAAC	200
ACTGTGTCTA	TATTTGCTCT	TGGACCATCA	ATAACAGATG	ACAATGATAA	250
AATGACATTG	GCTCTCTCT	TTTTGTCCTA	TTCTTTAGAC	AATGAAAAGC	300
AGCATGCGCA	AAGAGCTGGA	TTTTAGTTT	CTCTGTTATC	AATGGCTTAT	350
GCCAACCCAG	AATTATATT	AACATCAAAT	GGTAGTAATG	CAGATGTTAA	400
ATATGTTATC	TACATGATAG	AGAAAGACCC	AGGAAGACAG	AAATATGGTG	450
GGTTTGTGCGT	CAAGACTAGA	GAGATGGTT	ATGAAAAGAC	AACTGATTGG	500
ATGTTGGGA	GTGATCTTGA	GTATGATCAA	GACAATATGT	TGCAAAATGG	550
TAGAAGCACT	TCTACAATCG	AGGATCTGT	TCATACTTT	GGATATCCAT	600
CGTGTCTGG	AGCCCTTATA	ATCCAAGTTT	GGATAAATCT	TGTTAAGGCT	650
ATAACCAGTA	TATCAGGATT	GAGGAAAGGA	TTCTTTACTC	GGTTAGAAGC	700
ATTTCGACAA	GATGGAACAG	TTAAATCCAG	TCTAGTGTG	AGCGGTGATG	750
CAGTAGAACAA	AATTGGATCA	ATTATGAGGT	CCCAACAGAG	CTTGGTAACA	800
CTCATGGTTG	AAACACTGAT	AACAATGAAC	ACAGGCAGGA	ATGATCTGAC	850
AACAATAGAA	AAAATATAC	AGATTGTAGG	AAACTACATC	AGAGATGCAG	900
GTCTTGCTTC	ATTTTCAAC	ACAATCAGAT	ATGGCATTGA	GA CAGATGATG	950
GCAGCTCTAA	CTCTGTCTAC	CCTTAGACCG	GATATCAACA	GA CTCAGGC	1000
ACTGATCGAG	TTATATCTAT	CAAAGGGCC	ACGTGCTCCT	TTTATATGCA	1050
TTTGAGAGA	TCCC GTGCAT	GGTGAGTTG	CACCAGGCAA	CTATCCTGCC	1100
CTCTGGAGTT	ATGCGATGGG	TGTAGCAGTT	GTACAAAACA	AGGCCATGCA	1150
ACAGTATGTA	ACAGGAAGGT	CTTATCTGGA	TATTGAAATG	TTCCAAC TTG	1200
GTCAAGCAGT	GGCACGTGAT	GCCGAGTCGC	AGATGAGTTC	AATATTAGAG	1250
GATGAACTGG	GGGTACACACA	AGAAGCCAAG	CAAAGCTGAA	AGAAACACAT	1300
GAAGAACATC	AGCAGTTCA G	ATACAACCTT	TCATAAGCCT	ACAGGGGGAT	1350
CAGCCATAGA	AATGGCGATA	GATGAAGAAG	CAGGGCAGCC	TGAATCCAGA	1400
GGAGATCAGG	ATCAAGGAGA	TGAGCCTCGG	TCATCCATAG	TTCCTTATGC	1450
ATGGGCAGAC	GAAACCGGGG	ATGACAATCA	AACTGAATCA	ACTACAGAAA	1500
TTGACAGCAT	CAAAACTGAA	CAAAGAAACA	TCAGAGACAG	GCTGAACAAA	1550
AGACTCAACG	AGAAAAGGAA	ACAGAGTGAC	CCGAGATCAA	CTGACATCAC	1600
AAACAAACACA	AATCAAAC TG	AAATAGATGA	TTTGTTCAGT	GCATT CGAA	1650
GCAACTAGTC	ACAAAGAGAT	GACCACTATC	ACCAGCAACA	AGTAAGAAAA	1700
ACTTAGGATT	AATGGAAATT	ATCCAATCCA	GAGACGGAAG	GACAAATCCA	1750
GAATCCAACC	ACAAC TCAAT	CAACCAAAGA	TTCATGGAAAG	ACAATGTTCA	1800
AAACAAATCAA	ATCATGGATT	CTTGGGAAGA	GGGATCAGGA	GATAAATCAT	1850
CTGACATCTC	ATCGGCCCTC	GACATCATTG	AATTCTACT	CAGCACC GAC	1900
TCCCAAGAGA	ACACGGCGAGA	CAGCAATGAA	ATCAACACAG	GAACCACAAG	1950
ACTTAGCAGC	ACAATCTACC	AACCTGAATC	CAAACAAACA	GAACAAAGCA	2000
AGGAAAATAG	TGGACCAGCT	AAACAAAATC	GACAGTTTG	GGCATCACAC	2050
GAACGTGCCA	CAGAGACAAA	AGATAGAAAT	GTAAATCAGG	AGACTGTACA	2100
GGGAGGATAT	AGGAGAGGAA	GCAGCCCAGA	TAGTAGAACT	GAGACTATGG	2150
TCACTCGAAG	AATCTCCAGA	AGCAGCCCAG	ATCCTAACAA	TGGAACCCAA	2200
ATCCAGGAAG	ATATTGATTA	CAATGAAGTT	GGAGAGATGG	ATAAGGACTC	2250
TACTAAGAGGG	GAAATGCGAC	AATTAAAGA	TGTTCCAGTC	AAGGTATCAG	2300
GAAGTGATGC	CATT CCTCCA	ACAAAACAAG	ATGGAGACGG	TGATGATGGA	2350

FIG. 6A

ES 2 312 347 T3

AGAGGCCTGG	AATCTATCAG	TACATTTGAT	TCAGGATATA	CCAGTATACT	2400
GAATGCCGCA	ACACTAGATG	ACGAAGAAGA	ACTCCTTATG	AAGAACAAACA	2450
GGCCAAGAAA	GTATCAATCA	ACACCCCAGA	ACAGTGACAA	GGGAATTAAA	2500
AAAGGGGTTG	GAAGGCCAAA	AGACACAGAC	AAACAATCAT	CAATATTGGA	2550
CTACGAACTC	AACTTCAAAG	GATCGAAGAA	GAGCCAGAAA	ATCCTCAAAG	2600
CCAGCACGAA	TACAGGAGAA	CCAACAAGAC	CACAGAATGG	ATCCCAGGGG	2650
AAGAGAAATCA	CATCCTGGAA	CATCCTCAAC	AGCGAGAGCG	GCAATCGAAC	2700
AGAATCAACA	AACCAAACCC	ATCAGACATC	AACCTCGGGA	CAGAACCCACA	2750
CAATGGGACC	AAGCAGAACAA	ACCTCCGAAC	CAAGGATCAA	GACACAAAAG	2800
ACGGATGGAA	AGGAAAGAGA	GGACACAGAA	GAGAGCACTC	GATTTACAGA	2850
AAGGGCGATT	ACATTATTAC	AGAATCTTGG	TGTAATCCAA	TCTGCAGCAA	2900
AATTAGACCT	ATACCAAGAC	AAGAGAGTTG	TGTGTGTGGC	GAATGTCCTA	2950
AACAATGCAG	ATACTGCATC	AAAGATAGAC	TTCCCTAGCAG	TTTGATGAT	3000
AGGAGTGTCA	ATGGATCATG	ATACCAAATT	AAATCAGATT	CAGAACGAGA	3050
TATTAAGTTT	AAAAACTGAT	CTTAAAAGA	TGGATGAATC	ACATAGAAGA	3100
CTAATTGAGA	ATCAAAAAGA	ACAATTATCA	CTGATCACAT	CATTAATCTC	3150
AAATCTAAA	ATTATGACAG	AGAGAGGAGG	GAAGAAGGAC	CAACCAGAAC	3200
CTAGCGGGAG	GACATCCATG	ATCAAGACAA	AAGCAAAAGA	AGAGAAAATA	3250
AAGAAAGTCA	GTTTGACCC	TCTTATGGAA	ACACAGGGCA	TCGAGAAAAAA	3300
CATCCCTGAC	CTCTATAGAT	CAATAGAGAA	AACACCAGAA	AACGACACAC	3350
AGATCAAATC	AGAAATAAAC	AGATTGAATG	ATGAATCCAA	TGCCACTAGA	3400
TTAGTACCTA	GAAGAATAAG	CACTACAATG	AGATCATTAA	TAATAATCAT	3450
TAACAAACAGC	AATTATCAT	CAAAAGCAA	GCAATCATA	ATCAACGAAC	3500
TCAAGCTCTG	CAAGAGTGAC	GAGGAAGTGT	CTGAGTTGAT	GGACATGTT	3550
AATGAGGATG	TCAGCTCCC	GTAAACCGCC	AACCAAGGTT	CAACACCAAG	3600
AAAACCAATA	GCACAAAACA	GCCAATCAGA	GACCACCCCA	ATACACCAAA	3650
CCAATCAACA	CATAACAAAG	ATCTCCAGAT	CATAGATGAT	TAAGAAAAAC	3700
TTAGGATGAA	AGGACTAATC	AATCCTCCGA	AACAATGAGC	ATCACCAACT	3750
CCACAATCTA	CACATTCCC	GAATCCTCTT	TCTCCGAGAA	TGGCAACATA	3800
GAGCCGTTAC	CACTCAAGGT	CAATGAACAG	AGAAAGGCCA	TACCTCATAT	3850
TAGGTTGTC	AAGATAGGAG	ATCCGCCAA	ACATGGATCC	AGATATCTGG	3900
ATGTCTTTT	ACTGGGCTTC	TTTGAGATGG	AAAGGTCAAA	AGACAGGTAT	3950
GGGAGCATAA	GTGATCTAGA	TGATGATCCA	AGTTACAAGG	TTTGTGGCTC	4000
TGGATCATTG	CCACTTGGGT	TGGCTAGATA	CACCGGAAAT	GATCAGGAAC	4050
TCCTACAGGC	TGCAACCAAG	CTCGATATAG	AAGTAAGAAG	AACTGTAAAG	4100
GCTACGGAGA	TGATAGTTA	CACTGTACAA	AACATCAAAC	CTGAACTATA	4150
TCCATGGTCC	AGTAGATTAA	GAAAAGGGAT	GTTATTGAC	GCTAATAAAGG	4200
TTGCACCTGC	TCCTCAATGT	CTTCCACTAG	ATAGAGGGAT	AAAATTCAAG	4250
GTGATATTTG	TGAAC TGAC	AGCAATTGGA	TCAATAACTC	TATTCAAAT	4300
CCCTAAGTCC	ATGGCATTGT	TATCATTGCC	TAATACAATA	TCAATAAAATC	4350
TACAAGTACA	TATCAAAACA	GGAGTTCAGA	CAGATTCAA	AGGAGTAGTT	4400
CAGATTCTAG	ATGAAAAAGG	TGAAAAATCA	CTAAATTCA	TGGTTCATCT	4450
CGGGTTGATC	AAAAGGAAGA	TGGGCAGAAT	GTACTCAGTT	GAATATTGTA	4500
AGCAGAAAGAT	CGAGAAGATG	AGATTATTAT	TCTCATTGGG	ATTAGTTGGA	4550
GGGATCAGCT	TCCACGTCAA	CGCAACTGGC	TCTATATCAA	AGACATTAGC	4600
AAGTCAATTA	GCATTCAAAA	GAGAAATCTG	CTATCCCCTA	ATGGATCTGA	4650
ATCCACACTT	AAATTCAAGT	ATATGGGCAT	CATCAGTTGA	AATTACAAGG	4700

FIG. 6B

ES 2 312 347 T3

GTAGATGCAG	TTCTCCAGCC	TTCATTACCT	GGCGAATTCA	GATACTACCC	4750
AAACATCATA	GCAAAAGGGG	TCGGGAAAT	CAGACAGTAA	AATCAACAAC	4800
CCTGATATCC	AACATTGCAA	ATCAGGCTAC	CCACAGGAGA	AAAATCAAAA	4850
ACTTAGGATC	AAAGGGATCA	CCACGAACCC	CGGAAAACAG	CCAAACAAAC	4900
CAACACACAA	ATCACAGACA	AAAAGGAGAA	GGCACTGCAA	AGACCGAGAA	4950
AAAACAGAAC	GCACACAACC	AAGCAGAGAA	AAGCCAAGC	CCGCCATTCA	5000
CAAACACACC	AAACAATCCTG	CAAACAAGCA	CCAAAACAGA	GGTCAAAAGA	5050
CAAAGAGCAC	CAGATATGAC	CATCACAAACC	ACAATCATAG	CCATATTACT	5100
AATACCCCCA	TCATTTGTC	AAATAGACAT	AACAAAATG	CAACGTGTAG	5150
GTGTGTTAGT	CAACAATCCT	AAAGGCATGA	AGATTTCACA	AAATTCGAA	5200
ACGAGATACC	TGATATTAAG	TTTGATACCC	AAAATAGAGA	ATTCACACTC	5250
ATGTGGGGAT	CAACAGATAA	ACCAATACAA	GAAGTTATTG	GATAGATTGA	5300
TAATTCCCTCT	ATATGATGGA	TTAAAATTAC	AAAAGATGT	AATAGTAGTA	5350
AGTCATGAAA	CCCACAACAA	TACTAATCTT	AGGACAAAAC	GATTCTTGG	5400
AGAGATAATT	GGGACAATTG	CGATAGGGAT	AGCCACTTCA	GCACAAATCA	5450
CCGCAGCAGT	CGCTCTTGTG	GAAGCTAAC	AGGCAAAGTC	AGACATAGAA	5500
AAACTCAAAG	AGGCTATAAG	AGACACAAAC	AAGGCAGTAC	AATCGATTCA	5550
AAGTTCTGTA	GGTAACCTAA	TTGTTGCAGT	AAAATCAGTT	CAAGACTATG	5600
TCAACAATGA	AATTATACCT	TCAATCACAA	GATTAGGCTG	TGAAGCAGCA	5650
GGGTTACAAT	TGGGAATTGC	ATTGACACAA	CATTACTCAG	AATTAACAAA	5700
TATATTTGGT	GATAATATAG	GAACACTGAA	AGAAAAAGGG	ATAAAATTAC	5750
AAGGGATAGC	ATCATTATAT	CACACAAACA	TAACGGAAAT	ATTTACTACT	5800
TCAACAGTTG	ACCAATATGA	TATTTATGAC	CTATTATTCA	CTGAGTCAAT	5850
CAAGATGAGA	GTGATAGATG	TTGATTTGAG	TGATTACTCA	ATTACTCTTC	5900
AAGTTAGACT	TCCTTTATTA	ACTAAACTAT	CAAATACTCA	ATTTATAAA	5950
GTAGATTCTA	TATCATACAA	CATCCAGGGC	AAAGAGTGGT	ATATTCCCT	6000
TCCCAATCAC	ATCATGACAA	AAGGGGCTTT	TCTAGGTGGT	GCTGATATTAA	6050
AAGAATGCAT	AGAGGCATTC	AGCAGTTATA	TATGTCCTTC	TGATCCAGGT	6100
TACATATTAA	ATCACGAGAT	AGAGAATTGT	TTATCAGGGA	ACATAACACA	6150
GTGTCCTAAG	ACTGTTGTTA	CATCAGATGT	GGTACCAACGA	TACGCCCTTG	6200
TGAATGGTGG	ATTAATTGCA	AACTGCATAA	CAACTACATG	TACATGCAAT	6250
GGAATTGACA	ATAGAATTAA	TCAATCACCT	GATCAAGGAA	TTAAGATCAT	6300
AACACATAAA	GAATGCCAGG	TAATAGGTAT	AAACGGAATG	TTATTCAATA	6350
CTAATAGAGA	AGGGACATTA	GCAACTTATA	CATTGATGA	CATCATATTA	6400
AATAACTCTG	TTGCACTTAA	TCCAATTGAT	ATATCTATGG	AACTCAACAA	6450
GGCAAAACTA	GAATTAGAAG	AATCGAAGGA	ATGGATAAAG	AAATCAAATC	6500
AAAAGTTAGA	TTCCGTTGGA	AGTTGGTATC	AATCTAGTGC	AACAATCACC	6550
ATAATCATAG	TGATGATAAT	AATTCTAGTT	ATAATCAATA	TAACAATTAT	6600
TGTAGTCATA	ATCAAATTCC	ATAGAATTCA	GGGGAAAGAT	CAAACGACA	6650
AAAACAGTGA	GCCGTATATA	CTGACAAATA	GACAATAAGA	CTATACACGA	6700
TCAAATATAA	AAAGTACAAA	AAACTTAGGA	ACAAAGTTGT	TCAACACAGC	6750
AGCACCGAAT	AGACCAAAAG	GCAGCGCAGA	GGCGACACCA	AACTCAAAAA	6800
TGGAATATTG	GAAACACACA	AACAGCATAA	ATAACACCAA	CAATGAAACC	6850
GAAACAGCCA	GAGGCAAACA	TAGTAGCAAG	GTTACAAATA	TCATAATGTA	6900
CACCTTCTGG	ACAATAACAT	TAACAATATT	ATCACTCATT	TTTATAATGA	6950
TATTGACAAA	CTTAATTCAA	GAGAACAAATC	ATAATAAATT	AATGTTGCAG	7000
GAAATAAGAA	AAGAATTCGC	GGCAATAGAC	ACCAAGATTG	AGAGGACTTC	7050

FIG. 6C

ES 2 312 347 T3

GGATGACATT GGAACCTCAA TACAGTCAGG AATAAATACA AGACTTCTCA	7100
CAATTCAAGAG TCATGTTCAA AACTATATCC CACTATCATT AACACAACAA	7150
ATGTCAGATC TCAGAAAATT TATCAATGAT CTAACAAATA AAAGAGAACAA	7200
TCAAGAAGTG CCAATACAGA GAATGACTCA TGATAGAGGT ATAGAACCCC	7250
TAAATCCAAA CAAGTTCTGG AGGTGTACAT CTGGTAACCC ATCTCTAACAA	7300
AGTAGTCCTA AGATAAGGTT AATACCAGGA CCAGGTTTAT TAGCACACATC	7350
TACTACAGTA AATGGCTGTA TTAGAATTCC ATCGTTAGTA ATCAATCATC	7400
TAATCTATGC TTACACCTCT AATCTTATTA CCCAGGGCTG TCAAGATATA	7450
GGGAAATCTT ACCAAGTACT ACAAAATAGGG ATAATTACTA TAAATTGGAA	7500
CCTAGTACCT GATTAAACC CCAGAGTCAC ACATACATT AATATTGATG	7550
ATAATAGAAG ATCTTGCTCT CTGGCACTAT TGAATACAGA TGTTTATCAG	7600
TTATGCTCAA CACCAAAAGT TGATGAAAGA TCCGATTATG CATCAACAGG	7650
TATTGAGGAT ATTGTACTTG ACATTGTCAC TAATAATGGA TTAATTATAA	7700
CAACAAAGTT TACAAATAAT AATATAACTT TTGATAAAACC GTATGCAGCA	7750
TTGTATCCAT CAGTGGGACC AGGAATCTAT TATAAGGATA AAGTTATATT	7800
TCTCGGATAT GGAGGTCTAG AGCATGAAGA AAACGGAGAC GTAATATGTA	7850
ATACAACCTGG TTGTCTGGC AAAACACAGA GAGACTGTAA TCAGGCTTCT	7900
TATAGCCCCAT GGTTCTCAA TAGGAGAATG GTAAACTCTA TTATTGTTGT	7950
TGATAAAAGGC ATAGATGCAA CTTTAGCTT GAGGGTGTGG ACTATTCCAA	8000
TGAGCCAAAA TTATTGGGA TCAGAAGGAA GATTACTTT ATTAGGTGAC	8050
AGAATATACA TATATACTAG ATCCACAACTT TGGCACAGTA AATTACAGTT	8100
AGGGGTAATT GATATTCTG ATTATACTAA TATAAGAATA AATTGGACTT	8150
GGCATAATGT ACTATCACCG CCAGGGAAATG ATGAATGTCC ATGGGGTCAT	8200
TCATGCCAG ACGGATGTAT AACAGGAGTT TACACTGATG CATATCCGCT	8250
AAACCCATCG GGGAGTGTG TATCATCAGT AATTCTTGAT TCACAAAAGT	8300
CTAGAGAAAA CCCAATCATT ACTTACTCAA CAGCTACAAA TAGAATAAAAT	8350
GAATTAGCTA TATATAACAG AACACTTCCA GCTGCATATA CAACAACAAA	8400
TTGTATCACA CATTATGATA AAGGGTATTG TTTTCATATA GTAGAAATAA	8450
ATCACAGAAG TTTGAATACG TTTCAACCTA TGTTATTCAA AACAGAAGTT	8500
CCAAAAAAACT GCAGCTAAAT TGATCATCGC ATATCGGATG CAAGATGACA	8550
TTAAAAGAGA CCACCAGAC GACAACACAG GAGACGATGC AAGATATAAA	8600
GAAATAATAA AAAACTTAGG AGAAAAGTGT GCAAGAAAAA TGGACACCGA	8650
GTCCCCACAGC GGCACAACAT CTGACATTCT GTACCCCTGAA TGTCACCTCA	8700
ATTCTCCTAT AGTTAAAGGA AAGATAGCAC AACTGCATAC AATAATGAGT	8750
TTGCCTCAGC CCTACGATAT GGATGATGAT TCAATACTGA TTATTACTAG	8800
ACAAAAAAATT AAACCTCAATA AATTAGATAA AAGACAACGG TCAATTAGGA	8850
AATTAAGATC AGTCTTAATG GAAAGAGTAA GTGATCTAGG TAAATATACC	8900
TTTATCAGAT ATCCAGAGAT GTCTAGTGAA ATGTTCCAAT TATGTATACC	8950
CGGAATTAAAT AATAAAATAA ATGAATTGCT AAGTAAAGCA AGTAAAACAT	9000
ATAATCAAAT GACTGATGGA TTAAGAGATC TATGGGTTAC TATACTATCG	9050
AAGTTAGCAT CGAAAAATGA TGGAAAGTAAT TATGATATCA ATGAAGATAT	9100
TAGCAATATA TCAAATGTTC ACATGACTTA TCAATCAGAC AAATGGTATA	9150
ATCCATTCAA GACATGGTT ACTATTAAGT ATGACATGAG AAGATTACAA	9200
AAAGCCAAAA ATGAGATTAC ATTCAATAGG CATAAAAGATT ATAATCTATT	9250
AGAAGACCAA AGAAATATAT TGCTGATACA TCCAGAACTC GTCTTAATAT	9300
TAGATAAAACA AAATTACAAT GGGTATATAA TGACTCCTGA ATTGGTACTA	9350
ATGTATTGTG ATGTAGTTGA AGGGAGGTGG AATATAAGTT CATGTGCAAA	9400

FIG. 6D

ES 2 312 347 T3

ATTGGATCCT	AAGTTACAAT	CAATGTATTA	TAAGGGTAAAC	AATTTATGGG	9450
AAATAATAGA	TGGACTATTTC	TCGACCTTAG	GAGAAAAGAAC	ATTTGACATA	9500
ATATCACTAT	TAGAACCACT	TGCATTATCG	CTCATTCAAA	CTTATGACCC	9550
GGTTAACACAG	CTCAGGGGGG	CTTTTTTAAA	TCACGTGTTA	TCAGAAAATGG	9600
AATTAATATT	TGCAGCTGAG	TGTACAACAG	AGGAAAATACC	TAATGTGGAT	9650
TATATAGATA	AAATTCTAGA	TGTGTTCAAA	GAATCAACAA	TAGATGAAAT	9700
AGCAGAAATT	TTCTCTTCT	TCCGAACCTT	TGGACACCCCT	CCATTAGAGG	9750
CGAGTATAGC	AGCAGAGAAA	GTTAGAAAGT	ATATGTATAC	TGAGAAAATGC	9800
TTGAAATTG	ATACTATCAA	TAATGTCAT	GCTATTTTT	GTACAATAAT	9850
TATAATGGA	TATAGAGAAA	GACATGGTGG	TCAATGGCCT	CCAGTTACAT	9900
TACCTGTCCA	TGCACATGAA	TTTATCATAA	ATGCATACGG	ATCAAATTCT	9950
GCCATATCAT	ATGAGAATGC	TGTAGATTAT	TATAAGAGCT	TCATAGGAAT	10000
AAAATTGAC	AAGTTTATAG	AGCCTCAATT	GGATGAAGAC	TTAACTATTT	10050
ATATGAAAGA	TAAAGCATT	TCCCCAAAGA	AATCAAACCTG	GGACACAGTC	10100
TATCCAGCTT	CAAACCTGTT	ATACCGCACT	AATGTGTCTC	ATGATTACCG	10150
AAGATTGGTT	GAAGTATT	TAGCAGATAG	TAATTTGAT	CCCCACCAAG	10200
TATTAGATTA	CGTAGAATCA	GGATATTGGC	TGGATGATCC	TGAATTAAAT	10250
ATCTCATATA	GTAAAGAAGA	GAAAGAAATA	AAACAAGAAG	GTAGACTTT	10300
TGCAAAATG	ACATACAAGA	TGAGGGCTAC	ACAAGTATT	TCAGAAACAT	10350
TATTGGCGAA	TAATATAGGG	AAATTCTTCC	AAGAGAATGG	GATGGTTAAA	10400
GGAGAAATTG	AATTACTCAA	GAGACTAAC	ACAATATCTA	TGTCTGGAGT	10450
TCCCGGGTAT	AATGAGGTAT	ACAATAATT	AAAAAGTCAC	ACAGAAGAAC	10500
TTCAAGCTT	TAATGCAATT	AGCAGTTCCA	ATTATCTTC	TAATCAGAAC	10550
TCAAAGAAGT	TTGAATTAA	ATCTACAGAT	ATATACAATG	ATGGATACGA	10600
AACCCTAAGC	TGCTTCTTAA	CGACAGATCT	AAAAAAATAT	TGTTAAATT	10650
GGAGGTATGA	ATCAACAGCT	TTATTGGTG	ATACTTGTAA	TCAGATATT	10700
GGGTTAAAGG	AATTATTAA	TTGGCTGCAC	CCTCGCCTTG	AAAAGAGTAC	10750
AATATATGTT	GGAGATCCTT	ATTGCCCGCC	ATCAGATATT	GAACATTTAC	10800
CACTTGATGA	CCATCCTGAT	TCAGGATTT	ATGTTCATAA	TCCTAAAGGA	10850
GGAATAGAAC	GGTTTGCCA	AAAGTTATGG	ACACTCATAT	CTATCAGTGC	10900
AATACATT	GCAGCTGTCA	AAATCGGTGT	AAGAGTTACT	GCAATGGTC	10950
AAGGGGATAA	TCAAGCCATA	GCTGTTACCA	CAAGAGTACC	TAATAATTAT	11000
GATTATAAAG	TTAAGAAAGA	GATTGTTAT	AAAGATGTGG	TAAGATTTT	11050
TGATTCCCTG	AGAGAGGTGA	TGGATGATCT	GGGTCTGAG	CTCAAACCTAA	11100
ATGAAACTAT	AATAAGTAGT	AAAATGTTA	TATATAGCAA	AAGGATATAC	11150
TATGACGGAA	GAATCCTTCC	TCAGGCATTA	AAAGCATTGT	CTAGATGTGT	11200
TTTTGGTCT	GAAACAATCA	TAGATGAGAC	AAGATCAGCA	TCCTCAAATC	11250
TGGCTACATC	GTTGCAAAG	GCCATTGAGA	ATGGCTACTC	ACCTGTATTG	11300
GGATATGTAT	GCTCAATCTT	AAAAAATATC	CAACAGTTGT	ATATAGCGCT	11350
TGGAATGAAT	ATAAACCCAA	CTATAACCC	AAATATTAAA	GATCAATATT	11400
TCAGGAATAT	TCATTGGATG	CAATATGCC	CCTTAATCCC	TGCTAGTGT	11450
GGAGGAGTTA	ATTATATGGC	CATGTCAAGG	TGTTTGTCA	GAAACATTGG	11500
AGATCCTACA	GTCGCTGCCT	TAGCCGATAT	AAAAAGATT	ATAAAAGCAA	11550
ATTGTTAGA	TCGAGGTGTC	CTTACAGAA	TTATGAATCA	AGAACCAGGC	11600
GAGTCTTCTT	TTTGTAGACTG	GGCCTCAGAT	CCCTATTCTAT	GTAACTTACC	11650
ACAATCTAA	AATATAACCA	CCATGATAAA	GAATATAACT	GCAAGAAATG	11700
TACTACAGGA	CTCACCAAAAC	CCATTACTAT	CTGGATTATT	TACAAGTACA	11750

FIG. 6E

ES 2 312 347 T3

ATGATAGAAG	AGGATGAGGA	ATTAGCTGAG	TTCCTAATGG	ACAGGGAGAAT	11800
AATCCTCCCA	AGAGTTGCAC	ATGACATTAA	AGATAATTCT	CTTACTGGAA	11850
TTAGGAATGC	TATAGCTGGT	ATGTTGGATA	CAACAAAATC	ACTAATTCGA	11900
GTAGGGATAA	GCAGAGGAGG	ATTAACCTAT	AACTTATTAA	GAAAGATAAG	11950
CAACTATGAT	CTTGTACAAT	ATGAGACACT	TAGTAAAAC	TTAAGACTAA	12000
TAGTCAGTGA	CAAGATTAAG	TATGAAGATA	TGTGCTCAGT	AGACCTAGCC	12050
ATATCATTAA	GACAAAAAAAT	GTGGATGCAT	TTATCAGGAG	GAAGAATGAT	12100
AAATGGACTT	GAAACTCCAG	ATCCTTTAGA	GTTACTGTCT	GGAGTAATAA	12150
TAACAGGATC	TGAACATTGT	AGGATATGTT	ATTCAACTGA	AGGTGAAAGC	12200
CCATATACAT	GGATGTATTT	ACCAGGCAAT	CTTAATATAG	GATCAGCTGA	12250
GACAGGAATA	GCATCATTAA	GGGTCCCTTA	CTTTGGATCA	GTTACAGATG	12300
AGAGATCTGA	AGCACAAATA	GGGTATATCA	AAAATCTAAG	CAAACCCAGCT	12350
AAGGCTGCTA	TAAGAATAGC	AATGATATAT	ACTTGGGCAT	TTGGGAATGA	12400
CGAAATATCT	TGGATGGAAG	CATCACAGAT	TGCACAAACA	CGTGCAAAC	12450
TTACATTGGA	TAGCTTAAAG	ATTTGACAC	CAGTGACAAC	ATCAACAAAT	12500
CTATCACACA	GGTTAAAAGA	TACTGCTACT	CAGATGAAAT	TTTCTAGTAC	12550
ATCACTTATT	AGAGTAAGCA	GGTCATCAC	AATATCTAAT	GATAATATGT	12600
CTATTAAAGA	AGCAAATGAA	ACTAAAGATA	CAAATCTTAT	TTATCAACAG	12650
GTAATGTTAA	CAGGATTAAG	TGTATTTGAA	TATCTATTTA	GGTTAGAGGA	12700
GAGTACAGGA	CATAACCCCTA	TGGTCATGCA	TCTACATATA	GAGGATGGAT	12750
GTTGTATAAA	AGAGAGITAC	AATGATGAGC	ATATCAATCC	GGAGTCTACA	12800
TTAGAGTTAA	TCAAATACCC	TGAGAGTAAT	GAATTATAT	ATGATAAGGA	12850
CCCTTAAAG	GATATAGATC	TATCAAAATT	AATGGTTATA	AGAGATCATT	12900
CTTATACAAT	TGACATGAAT	TACTGGGATG	ACACAGATAT	TGTACATGCA	12950
ATATCAATAT	GTACTGCAGT	TACAATAGCA	GATACAATGT	CGCAGCTAGA	13000
TCGGGATAAT	CTTAAGGGAGC	TGGTTGTGAT	TGCAAATGAT	GATGATATTA	13050
ACAGTCTGAT	AACTGAATT	CTGACCCCTAG	ATATACTAGT	TTTCTCAA	13100
ACATTGGAG	GGTTACTCGT	GAATCAATT	GCATATAACCC	TTTATGGATT	13150
GAAAATAGAA	CCAAGGGATC	CCATTTGGGA	TTATATAATG	AGAACATTAA	13200
AAGACACCTC	ACATTCACTA	CTTAAAGTAT	TATCTAATGC	ACTATCTCAT	13250
CCAAAAGTGT	TTAAGAGATT	TTGGGATTGT	GGAGTTTGA	ATCCTATTAA	13300
TGGTCCTAAT	ACTGCTAGTC	AAGATCAAGT	TAAGCTTGCT	CTCTCGATTT	13350
GCGAGTACTC	CTTGGATCTA	TTTATGAGAG	AATGGTTGAA	TGGAGCATCA	13400
CTTGAGATCT	ATATCTGTGA	TAGTGACATG	GAATAGCAA	ATGACAGAAG	13450
ACAAGCATT	CTCTCAAGAC	ATCTTGCCTT	TGTGTGTTGT	TTAGCAGAGA	13500
TAGCATCTT	TGGACCAAAT	TTATTAATC	TAACATATCT	AGAGAGACTT	13550
GATGAATTAA	AACAATACTT	AGATCTGAAC	ATCAAAGAAG	ATCCTACTCT	13600
TAAATATGTG	CAAGTATCAG	GACTGTTAAT	AAAATCATTC	CCCTCAACTG	13650
TTACGTATGT	AAGGAAAAC	GCGATTAAGT	ATCTGAGGAT	TCGTGGTATT	13700
AATCCGCCTG	AAACGATGTA	AGATTGGGAT	CCCATAGAAG	ATGAGAATAT	13750
CTTAGACAAT	ATTGTTAAA	CTGTAAATGA	CAATTGCAGT	GATAATCAA	13800
AGAGAAATAA	AAGTAGTTAT	TTCTGGGAT	TAGCTCTAAA	GAATTATCAA	13850
GTCGTGAAAA	TAAGATCCAT	AACGAGTGAT	TCTGAAGTTA	ATGAAGCTTC	13900
GAATGTTACT	ACACATGGAA	TGACACTTCC	TCAGGGAGGA	AGTTATCTAT	13950
CACATCAGCT	GAGGTTATTT	GGAGTAAACA	GTACAAGTTG	TCTTAAAGCT	14000
CTTGAATTAT	CACAAATCTT	AATGAGGGAA	GTTAAAAAAG	ATAAAAGATAG	14050
ACTCTTTTA	GGAGAAGGAG	CAGGAGCTAT	GTTAGCATGT	TATGATGCTA	14100

FIG. 6F

ES 2 312 347 T3

CACTCGGTCC	TGCAATAAAT	TATTATAATT	CTGGTTAAA	TATTACAGAT	14150
GTAATTGGTC	AACGGGAATT	AAAAATCTTC	CCATCAGAAG	TATCATTAGT	14200
AGGTAAAAAA	CTAGGAAATG	TAACACAGAT	TCTTAATCGG	GTGAGGGTGT	14250
TATTTAATGG	GAATCCAAT	TCAACATGGA	TAGGAAATAT	GGAATGTGAG	14300
AGTTTAATAT	GGAGTGAATT	AAATGATAAG	TCAATTGGTT	TAGTACATTG	14350
TGACATGGAG	GGAGCGATAG	GCAAATCAGA	AGAAACTGTT	CTACATGAAC	14400
ATTATAGTAT	TATAGGATT	ACATATTAA	TCGGGGATGA	TGATGTTGTC	14450
CTAGTATCAA	AAATTATACC	AACTATTACT	CCGAATTGGT	CTAAAATACT	14500
CTATCTATAC	AAGTTGTATT	GGAAGGATGT	AAGTGTAGTG	TCCCCTAAAA	14550
CATCCAATCC	TGCCTCAACA	GAGCTTTATT	TAATTCAAA	AGATGCTTAC	14600
TGTACTGTAA	TGGAACCCAG	TAATCTGTT	TTATCAAAC	TTAAAAGGAT	14650
ATCATCAATA	GAAGAAAATA	ATCTATTAAA	GTGGATAATC	TTATCAAAAA	14700
GGAAGAATAA	CGAGTGGTTA	CAGCATGAAA	TCAAAGAAGG	. AGAAAGGGAT	14750
TATGGGATAA	TGAGGCCATA	TCATACAGCA	CTGCAAATT	TTGGATTCCA	14800
AATTAACCTA	AATCACTTAG	CTAGAGAATT	TTTATCACT	CCTGATTAA	14850
CCAACATTAA	TAATATAATT	CAAAGTTTA	CAAGAACAA	TAAAGATGTT	14900
ATGTTCGAAT	GGGTCAATAT	CACTCATGAC	AATAAAAGAC	ATAAATTAGG	14950
AGGAAGATAT	AATCTATTCC	CGCTTAAAAA	TAAGGGAAA	TTAAGATTAT	15000
TATCACGAAAG	ATTAGTACTA	AGCTGGATAT	CATTATCCTT	ATCAACCAGA	15050
TTACTGACGG	GCCGTTTCC	AGATGAAAAA	TTGAAAATA	GGGCACAGAC	15100
CGGATATGTA	TCATTGGCTG	ATATTGATT	AGAATCCTT	AAGTTATTAT	15150
CAAGAAATAT	TGTAAAAAT	TACAAAGAAC	ACATAGGATT	AATATCATA	15200
TGGTTTTGA	CCAAAGAGGT	CAAATACTA	ATGAAGCTT	TAGGAGGAGT	15250
CAAACACTA	GGAATCCTA	AACAGTACAA	AGAGTTAGAG	GATCGATCAT	15300
CTCAGGGTTA	TGAATATGAT	AATGAATTG	ATATTGATTA	ATACATAAAA	15350
ACATAAAATA	AAACACCTAT	TCCTCACCCA	TTCACTTCCA	ACAAAATGAA	15400
AAGTAAGAAA	AACATGTAAT	ATATATATAC	CAAACAGAGT	TTTTCTCTTG	15450
TTTGGT					15456

FIG. 6G

ES 2 312 347 T3

ACCAAACAAG	AGAAGAGACT	TGCTTGGAA	TATTAATTCA	AATAAAAATT	50
AACTTAGGAT	TAAAGAACCT	TACCGAAAGG	TAAGGGGAAA	GAAATCCTAA	100
GAATGTAATC	ATGTTGAGTC	TATTCGACAC	ATTCACTGCG	CGTAGGCAGG	150
AGAACATAAC	AAAATCAGCT	GGTGGGGCTG	TTATTCCCGG	GCAAAAAAAC	200
ACTGTGTCTA	TATTTGCTCT	TGGACCATCA	ATAACAGATG	ACAATGACAA	250
AATGACATTG	GCTCTTCCT	TTTGTCTCA	TTCTTAGAC	AATGAAAAGC	300
AGCATGCGCA	AAGAGCTGGA	TTTTAGTTT	CTCTGTTATC	AATGGCTTAT	350
GCCAACCCAG	AATTATATT	AAACATCAAAT	GGTAGTAATG	CAGATGTTAA	400
ATATGTCATC	TACATGATAG	AGAAAGACCC	AGGAAGACAG	AAATATGGTG	450
GGTTTGTGCGT	CAAGACTAGA	GAGATGGTT	ATGAAAAGAC	AACTGACTGG	500
ATGTTGGGA	GTGATCTTGA	GTATGATCAA	GACAATATGT	TGCAAAATGG	550
TAGAACACT	TCTACAATCG	AGGATCTTGT	TCATACTTT	GGATATCCAT	600
CGTGTCTTGG	AGCCCTTATA	ATCCAGGTTT	GGATAATACT	TGTTAAGGCT	650
ATAACCAGTA	TATCAGGATT	GAGGAAGGA	TTCTTACTC	GTGTTAGAAC	700
ATTCGACAA	GATGGAACAG	TTAAATCCAG	TCTAGTGTG	AGCGGGTGTG	750
CAGTAGAACAA	AATTGGATCA	ATTATGAGGT	CCCAACAGAG	CTTGGTAACA	800
CTCATGGTTG	AAACACTGAT	AAACATGAAC	ACAGGCAGGA	ATGACCTGAC	850
AACAATAGAA	AAGAATATAC	AGATTGTAGG	AAACTACATC	AGAGATGCAG	900
GTCTTGCTTC	ATTTTCAAC	ACAATCAGAT	ATGGCATTGA	GAATGAAATG	950
GCAGCTCTAA	CTCTGTCTAC	CCTTAGACCG	GACATCAACA	GAATCAAGGC	1000
ACTGATAGAG	CTATATCTAT	CAAAGGGGCC	ACGTGCTCCT	TTTATATGCA	1050
TTTGAGAGA	TCCTGTGCAT	GGTAGTTG	CACCAAGGCAA	CTATCCTGCC	1100
CTCTGGAGTT	ATGCGATGGG	TGTAGCAGTT	GTACAAAACA	AGGCCATGCA	1150
ACAGTATGTA	ACAGGAAGGT	CCTATCTGGA	TATTGAAATG	TTCCAACCTGG	1200
GTCAAGCAGT	GGCACGTGAC	GCCGAGTCGG	AGATGAGTTC	ATATTAAGAG	1250
GATGAACCTGG	GGGTACACACA	AGAAGCCAAG	CAAAGCTTGA	AGAAACACAT	1300
GAAGAACATC	AGCAGTTCA	ATACAACCTT	CTATAAGCCT	ACAGGGGGAT	1350
CAGCCATAGA	AATGGCAATA	GATGAGGAAG	CAGAGCAGCC	CGAATCCAGA	1400
GGAGACCAAG	ACCAAGGAGA	TGAACCTCGG	TCATCCATAG	TTCCTTATGC	1450
ATGGGCAGAC	GAAACCGGGG	ATGACAACCA	AACTGAATCA	ACCACAGAAA	1500
TTGACAGCAT	CAAAACTGAA	CAAAGAAACA	TCAGAGACAG	GCTGAACAAA	1550
AGACTCAACG	AGAAAAGGAA	ACAGAGTAAC	CCGGGATCAA	CTGACATCAC	1600
AAACAAACACA	AATCAAACCTG	AAATAGATGA	TTTATTCACT	GCATTGCAA	1650
GCAACTAGTC	ACAAAGAGAT	GACCACCATC	ATCAGCAACA	AGTAAGAAAA	1700
ACTTAGGATT	AATGGAAATT	ATCCAATCCG	GAGACGGAAG	GACAAATCCA	1750
GAATCCAACC	ACAACATCAAT	CAACCAAAGA	TTCATGGAAG	ACAATGTTCA	1800
AAACAATCAA	ATCATGGATT	CTTGGGAAGA	GGGATCAGGA	GATAAAATCAT	1850
CTGACATCTC	ATCGGCCCTC	GACATCATTG	AATTCTACT	CAACACCGAC	1900
TCCCAAGAGA	ACACGGCAGA	CAGCAATGAA	ATCAACACAG	GAGCCACAAG	1950
ACTTAGCACG	ACAATCTACC	AACTTGAGTC	CAAAACAACA	GAAACAAGCA	2000
AGGAAAATAG	TGGACCAAGCT	AAACAAAATC	GACAGTTGG	GGCATCACAC	2050
GAACGTGCCA	CAGAGACAAA	AGATAGAAAT	GTAAATCAGA	AGACTGTACA	2100
GGGAGGGATAT	AGGAGAGGAA	GCAGCCCAGA	TAGTAGAACT	GAGACTATGG	2150
TCACTCGAGG	AATCTCCAGA	AGCAGCCCCAG	ATCCTAACAA	TGGAACCAA	2200
ATCCAGGAAG	ATATTGATTA	CAATGAAGTT	GGAGAGATGG	ATAAGGACTC	2250
TACTAAGAGG	GAAATGCGAC	AATTAAAGA	TGTTCCAGTC	AAGGTATCAG	2300
GAAGTGTGATGC	CATTCCCTCCA	ACAAAACAAG	ATGGAGACGG	TGATGATGGA	2350

FIG. 7A

ES 2 312 347 T3

AGAGGCCTGG	AATCTATCAG	TACATCTGAT	TCAGGGATATA	CCAGTATAGT	2400
GAAGTCCGCA	ACACTAGATG	ACGAAGAAGA	ACTCCTTATG	AAGAACAAACA	2450
GGCCAAGAAA	GTATCAATCA	ACACCCCCAGA	ACAGTGACAA	GGGAATTAAA	2500
AAAGGGAGTG	GAAGGCCAAA	AGACACAGAC	AAACAATCAC	CAATATTGGA	2550
CTACGAACTC	AACTCCAAAG	GATCGAAGAA	GAGCCAGAAA	ATCCTCAAAG	2600
CCAGCACGAA	TACAGGAGAA	CCAACAAGAT	CACAGAGTGG	ATCCCAGGGG	2650
AAGAGAATCA	CATCCTGGAA	CATCCTCAAC	AGCGAGAGCG	GCAATCGAGC	2700
AGAATCAACA	AACCAAACCC	ATCAGACATC	AATCTCGGGG	CAGAACCCACA	2750
CAATGGGACC	AAGCAGAAC	ACCTCAGAAC	CAAGGACCAA	GACACAAAAG	2800
ACGGATGGAA	AGGAAAGAGA	GGACACAGAA	GAGAGCACTC	GATTACAGA	2850
AAGGGCGATT	ACATTATTAC	AGAATCTGG	TGTAATCCAA	TCTGCAGCAA	2900
AATTAGACCT	ATACCAAGAC	AAGAGAGTTG	TGTGTGTGGC	GAATGTCCTA	2950
AAACAATGCAG	ATACTGCATC	AAAGATAGAC	TTCTCTAGCAG	GTTCATGAT	3000
AGGAGTGTCA	ATGGATCATG	ATGTCAAATT	AAATCAGATT	CAGAACCGAGA	3050
TATTAAGTTT	AAAAACTGAT	CTTAAGAAGA	TGGATGAATC	ACATAGAAGA	3100
CTAATTGAGA	ATCAAAAAGA	ACAATTATCA	CTGATCACAT	CATTAATCTC	3150
AAATCTTAA	ATCATGACAG	AGAGAGGAGG	GAAGAAGGAC	CAACCAGAAC	3200
CTAGCGGGAG	GACATCCATG	ATCAAGACAA	AGGCAAAAGA	AGAGAGAATA	3250
AAGAAAGTCA	GGTTTGACCC	TCTTATGGAA	ACACAGGGCA	TCGAGAAAAAA	3300
CATCCCTGAC	CTCTACAGAT	CAATAGAGAA	AACACCAGAA	AACGACACAC	3350
AGATCAAATC	AGAAATAAAC	AGATTGAATG	ATGAATCCAA	TGCCACTAGA	3400
TTAGTACCTA	GAAGAATAAG	CAGTACAATG	AGATCACTAA	TAATAATCAT	3450
CAACAAACAGC	AATTATCAT	CAAAAGCAAA	GCAATCATAAC	ATCAACGAAC	3500
TCAAGCTCTG	CAAGAGTGT	GAGGAAGTGT	CTGAGTTGAT	GGACATGTT	3550
AATGAGGATG	TCAGCTCCC	GTAAACCGCC	AACCAAGGGT	CAACACCAAG	3600
AAAACCAACA	GCACAAAACA	GCCAATAAGA	GACCATCCCA	ACACACCGAA	3650
CCAATCAACA	CATAACAAAG	ATCTTAGAT	CATAGATGAC	TAAGAAAAAC	3700
TTAGGATGAA	AGGACTGATC	AATCCTCAA	AACAATGAGC	ATCACCACT	3750
CCACAACTCA	CACATTCCC	GAATCCTCTT	TCTCCGAGAA	TGGCAACATA	3800
GAGCCGTTAC	CACTCAAGGT	CAATGAACAG	AGAAAGGCCA	TACCTCATAT	3850
TAGGGTTGTC	AAGATAGGAG	ATCCGCCAA	ACATGGATCC	AGATATCTGG	3900
ATGTCTTTT	ACTGGGCTTC	TTTGAAATGG	AAAGGTCAAA	AGACAGGTAT	3950
GGGAGCATAA	GTGATCTAGA	TGATGATCCA	AGTTACAAGG	TTTGTGGCTC	4000
TGGATCATTG	CCACTTGGGT	TGGCTAGATA	CACTGGAAAT	GATCAGGAAC	4050
TCCTACAGGC	TGCAACCAAG	CTCGATATAG	AAAGTAAGAAG	AACTGTAAAG	4100
GCTACGGAGA	TGATAGTTA	CACTGTGCAA	AACATCAAAC	CTGAACACTATA	4150
TCCATGGTCC	AGTAGATTAA	AAAAAGGGAT	GTTATTTGAC	GCTAACAAAGG	4200
TTGCACTTGC	TCCTCAATGT	CTTCCACTAG	ATAGAGGGAT	AAAATTCAAGG	4250
GTGATATTG	TGAAC TGAC	AGCAATTGGA	TCAATAACTC	TATTCAAAAT	4300
CCCCAAGTCC	ATGGCATTGT	TATCATTGCC	TAATACAATA	TCAATAAAATC	4350
TACAAGTACA	TATCAAAACA	GGAATTCCAGA	CAGATTCCAA	AGGAGTAGTT	4400
CAGATTCTAG	ATGAAAAAGG	TGAAAAATCA	CTAAATTTC	TGGTTCATCT	4450
CGGGTTGATC	AAAAGGAAGA	TGGGTAGAAT	GTACTCAGTT	GAATATTGTA	4500
AGCAGAAGAT	TGAGAAGATG	AGATTATTAT	TCTCATTGGG	ATTAGTTGGA	4550
GGGATCAGCT	TCCACGTCAA	CGCAACTGGC	TCTATATCAA	AGACATTAGC	4600
AAGTCAATTA	GCATTTAAAA	GAGAAATCTG	CTATCCCCTA	ATGGATCTGA	4650
ATCCACACTT	AAATTTAGTT	ATATGGCATT	CATCAGTTGA	AATTACAAGA	4700

FIG. 7B

ES 2 312 347 T3

GTAGATGCAA	TTCTCCAGCC	TTCATTACCT	GGCGATTCA	GATACTACCC	4750
AAACATCATA	GCAAAAGGGG	TCGGGAAAAT	CAGACAGTAA	AACCAACAAC	4800
CCTGACATCC	AACACTGCAA	ATCAGGCTAC	CCACAGGAGA	AAAATCAAAA	4850
ACTTAGGATC	AAAGGGATCA	CCACAAACCC	CGGGAAACAG	CCAAACCAAC	4900
CAACACACAA	ATCACAGACA	AAAAGGAAAA	GGCACTGCAA	AGACCGAGAA	4950
CAAGCAGAAC	GCACACAACC	AAGCAGAGGA	AAGCCAAAGC	CCGCCATTCA	5000
CAAACACACC	AACAATCCTA	CAAACAAGCA	CCAAAATAGA	GGTCAAAAGA	5050
CAAAGAGCAT	CAGATATGAC	CATCACAACC	ATAATCATAG	CCATACTACT	5100
AATACCCCTA	TCATTCTGTC	AAATAGACAT	AACAAAATG	CAACGTGTAG	5150
GTGTATTAGT	CAACAATCCC	AAAGGCATGA	AAATTTCACA	AAATTTGAA	5200
ACGAGATACC	TGATATTAAG	TCTGATACCC	AAAATAGAGA	ATTCACACTC	5250
ATGTGGGGAT	CAACAGATAA	ACCAATACAA	GAAGTTATTG	GATAGATTGA	5300
TAATTCCCTCT	ATATGATGGA	TTAAAATTAC	AAAAAGATGT	AATAGTAGTA	5350
AGTCATGAAA	CCCATAATAA	TACTAATCTT	AGGACAAAAC	GATTCTTGG	5400
AGAGATAATT	GGGACAATTG	CGATAGGGAT	AGCCACCTCA	GCGCAAATCA	5450
CCGCAGCAGT	CGCTCTTGTC	GAAGCTAAAC	AGGCAAGGTC	AGACATAGAA	5500
AAACTCAAAG	AAGCTATAAG	AGACACAAAC	AAGGCAGTAC	AATCGATTCA	5550
AAAGTCTGTA	GGTAACCTAA	TTGTTGCAGT	TAATCAGTT	CAAGACTATG	5600
TCAACAATGA	ATTGTACCT	TCAATCACAA	GATTAGGCTG	TGAAGCAGCA	5650
GGGTTACAAT	TGGGAATTGC	ACTGACACAA	CATTACTCAG	AATTAACAAA	5700
TATATTTGGT	GATAATATAG	GAACACTGAA	AGAAAAAGGG	ATAAAATTAC	5750
AGGGGATAGC	ATCGTTATAT	CATACAAACA	TAACAGAAAT	ATTTACTACT	5800
TCAACAGTTG	ACCAATATGA	TATTTATGAC	CTATTATTCA	CTGAATCAAT	5850
CAAGATGAGA	GTGATAGATG	TTGATTGAG	TGATTACTCA	ATTACTCTTC	5900
AAGTTAGACT	TCCTTTATTA	ACTAAAATAT	CAAATACTCA	GATTTATAAA	5950
GTAGATTCTA	TATCATACAA	CATCCAGGGC	AAAGAGTGGT	ATATTCCCTCT	6000
TCCCAATCAC	ATCATGACAA	AAGGGGCTTT	TCTAGGTGGT	GCTGATATTA	6050
AAGAATGCAT	AGAGGCATTTC	AGCAGTTATA	TATGTCCTTC	TGATCCAGGT	6100
TATATTTAA	ATCACGAGAT	AGAGAATTGT	TTATCAGGGA	ACATAACACA	6150
GTGTCCTAAG	ACTGTTGTTA	CATCAGATGT	GGTACCAACGA	TACGCGTTG	6200
TGAATGGTGG	ATTAATTGCA	AACTGCATAA	CAACTACATG	TACATGCAAT	6250
GGAAATTGACA	ATAGAATTAA	TCAATCACCT	GATCAAGGAA	TTAAGATCAT	6300
AACACATAAA	GAATGCCAGG	TAATAGGTAT	AAACGGAATG	TTATTCAATA	6350
CTAATAGAGA	AGGGACATTA	GCAACTTATA	CATTTGATGA	CATTATATTA	6400
AATAACTCTG	TTGCACTTAA	TCCAATTGAT	ATATCTATGG	AACTTAACAA	6450
GGCAAAACTA	GAATTAGAAG	AATCGAAGGA	ATGGATAAAG	AAATCAAATC	6500
AAAAGTTAGA	TTCCGTTGGA	AGTTGGTATC	AATCTAGTGC	AAACATCACC	6550
ATAATCATAG	TGATGATAAT	AATTCTATT	ATAATCAATA	TAACAATTAT	6600
TGTAGTCATA	ATCAAATTCT	ATAGAATTAA	GGGGAAAAT	CAAAACGACA	6650
AAAACAGTGA	GCCGTATATA	CTGACAAATA	GACAATAAGA	CTATACACGA	6700
TCAAATATAG	AAAGTACAAA	AAACTTAGGA	ACAAAGTTGT	TCAACACAGC	6750
AGCAGCGAAC	AGACCCAAAG	GCAGCGCAGA	GGCGACACCG	AAACCAAAAA	6800
TGGAATATTG	GAAACACACA	AACAGCACAA	AAAACACCAA	CAATGAAACC	6850
GAAACAACCA	GAGGCAAACA	CAGTAGCAAG	GTTACAAATA	TCATAATGTA	6900
CACCTCTGG	ACAATAACAT	CAACAATATT	ATTAGTCATT	TTTATAATGA	6950
TATTGACAAA	CTTAATTCAA	GAGAACAATC	ATAATAAATT	AATGTTGCAG	7000
GAAATAAGAA	AAGAATTCGC	GGCAATAGAC	ACCAAGATTC	AGAGGACCTC	7050

FIG. 7C

ES 2 312 347 T3

GGATGACATT	GGAACCTCAA	TACAGTCAGG	AATAAAATACA	AGACTTCTCA	7100
CAATTTCAGAG	TCATGTTCAA	AACTATATCC	CACTATCACT	AAACACAACAA	7150
ATGTCAGATC	TCAGAAAATT	TATCAATGAT	CTAACAAATA	AAAGAGAACAA	7200
TCAAGAAGTG	CCAATACAGA	GAATGACTCA	TGATAGAGGT	ATAGAACCCC	7250
TAAATCCAGA	CAAGTTCTGG	AGGTGTACAT	CTGGTAACCC	ATCTCTAACAA	7300
AGTAGTCCTA	AGATAAGGTT	AATACCAGGG	CCAGGTTTAT	TAGCAACATC	7350
TACTACAGTA	AATGGCTGTA	TTAGAACCCC	ATCGTTAGCA	ATCAATCATT	7400
TAATCTACGC	TTACACCTCT	AATCTTATCA	CCCAGGGCTG	TCAAAATATA	7450
GGGAAATCTT	ACCAAGTACT	ACAAATAGGG	ATAATTACTA	AAATTTCGGA	7500
CCTAGTACCT	GATTAAATC	CCAGAGTCAC	ACATACATT	AATATTGATG	7550
ATAATAGGAA	ATCTGCTCT	CTGGCACTAT	TGAATACAGA	TGTTTATCAG	7600
TTATGCTCAA	CACCAAAAGT	TGATGAGAGA	TCCGATTATG	CATCAACAGG	7650
TATTGAGGAT	ATTGTACTTG	ACATTGTAC	TAATAATGGA	TTAATTATAAA	7700
CAACAAGGTT	TACAAATAAT	AATATAACTT	TTGATAAACCC	GTATGCAGCA	7750
TTGTATCCAT	CAGTAGGACC	AGGAATCTAT	TATAAGGGTA	AAAGTTATATT	7800
TCTCGGGATAT	GGAGGTCTAG	AGCATGAAGA	AAACGGAGAC	GTAATATGTA	7850
ATACAACCTGG	TTGTCCTGGC	AAAACACAGA	GAGACTGTAA	TCAGGCTTCT	7900
TATAGCCCCAT	GGTTCTCAA	TAGGAGAATG	GTAAACTCTA	TTATTGTTGT	7950
TGATAAAAGGC	ATAGATGCAA	CTTTAGCTT	GAGGGTGTGG	ACTATTCCAA	8000
TGAGCCAAAA	TTATTGGGGA	TCAGAAGGAA	GATTACTTT	ATTAGGTGAC	8050
AGAATATACA	TATATACTAG	ATCCACAAAGT	TGGCACAGTA	AATTACAGTT	8100
AGGGGTAATT	GATATTCTG	ATTATAATAA	TATAAGAATA	AATTGGACTT	8150
GGCATAATGT	ACTATCACGG	CCAGGAAATG	ATGAATGTCC	ATGGGGTCAT	8200
TCATGCCAG	ACGGATGTAT	AACAGGAGTT	TACACTGTAT	CATATCCGCT	8250
AAACCCATCG	GGGAGTGTG	TATCATCACT	AATTCTTGAC	TCACAAAAGT	8300
CTAGAGAAAA	CCCAATCATT	ACCTACTCAA	CAGCTACAAA	TAGAATAAAAT	8350
GAATTAGCTA	TATATAACAG	AAACACTTCA	GCTGCATATA	CAACAACAAA	8400
TTGTATCACA	CATTATGATA	AAGGGTATTG	TTTCATATA	GTAGAAATAA	8450
ATCACAGAAG	TTTGAATACG	TTTCAACCTA	TGTTATTCAA	AACAGAAGTT	8500
CCAAAAAAACT	GCAGCTAAAT	TGATCATCGC	ATATCGGATG	CCAGATGACA	8550
TTAAAAGAGA	CCACCAGACA	GACAACACAG	GAGATGATGC	AAGATATAAA	8600
GGAATAATAA	AAAACCTAGG	AGAAAAGTGT	GCAAGAAAAA	TGGACACTGA	8650
ATCCCACAGC	GGCACAAACAT	CTGACATTCT	GTACCCCTGAA	TGTCACCTCA	8700
ATTCTCCTAT	AGTTAAAGGA	AAAATAGCAC	AACTGCATAC	AATAATGAGT	8750
TTGCCCAAC	CCTACGATAT	GGATGATGAT	TCAATACTGA	TTATTACTAG	8800
ACAAAAAAATC	AAACTCAATA	AATTAGATAA	AGACAAACGG	TCAATTAGGA	8850
AATTAAGATC	AGTCTTAATG	GAAAGAGTAA	ATGATCTTGG	AAATACACCC	8900
TTTATCAGAT	ATCCAGAAAT	GTCTAGTAA	ATGTTCCAAT	TATGTATACC	8950
CGGAATTAAT	AATAAAATAA	ATGAATTGCT	AGTAAAGCA	AGTAAAACAT	9000
ATAATCAAAT	GAATGGTTT	ACTATTAAGT	ATGACATGAG	GAGATTACAA	9050
AAGTTAGCAT	CGAAAAATGA	TGGAAGTAAT	TATGATATCA	ATGAAGATAT	9100
TAGCAATATA	TCAAATGTTC	ACATGACTTA	CCAATCAGAC	AAATGGTATA	9150
ATCCATTCAA	GACATGGTTT	ACTATTAAGT	ATGACATGAG	GAGATTACAA	9200
AAAGCCAAAA	ATGAGATTAC	ATTCAATAGG	CATAAAGATT	ATAATCTATT	9250
AGAAGACCAA	AAGAATATAT	TGCTGATACA	TCCAGAACTC	GTCTTAATAT	9300
TAGATAAACAA	AAATTACAAT	GGGTATATAA	TGACTCCTGA	ATTGGTACTA	9350
ATGTATTGTG	ATGTAGTTGA	AGGGAGGTGG	AATATAAGTT	CATGTGCAAA	9400

FIG. 7D

ES 2 312 347 T3

ATTGGATCCT	AAATTACAAT	CAATGTATTA	TAAAGGTAAC	AATTTATGGG	9450
AAATAATAGA	TGGACTATTC	CTGACCTTAG	GAGAAGAAC	ATTTGACATA	9500
ATATCACTAT	TAGAACCGCT	TGCATTATCG	CTCATCAAA	CTCATGACCC	9550
GGTTAAACAG	CTCAGAGGGG	CTTTTTAAA	TCACGTGTTA	TCAGAAATGG	9600
AATCAATATT	CGCAGCTGAG	TGTACAACAG	AGGAATACC	TAATGTGGAT	9650
TATATAGATA	AAATTTAGA	TGTATTCAA	GAATCAACAA	TAGATGAAAT	9700
AGCAGAAATT	TTCTCTTCT	TCCGAACCTT	TGGACACCCCT	CCATTAGAGG	9750
CGAGTATAGC	AGCAGAGAAA	GTTAGAAAGT	ATATGTACAC	TGAGAAATGT	9800
TTGAAATTG	ATACTATCAA	AAATGTAT	GCTATTTTT	GTACAATAAT	9850
TATAAATGGA	TATAGAGAAA	GACATGGTGG	TCAATGGCCT	CCAGTTACAT	9900
TACCTATTCA	TGCACATGAA	TTTATCATAA	ATGCGTACGG	ATCAAATTCT	9950
GCCATATCAT	ATGAAAATGC	TGTAGATTAT	TATAAGAGCT	TCATAGGAAT	10000
AAAATTTGAC	AAGTTTATAG	AGCCTCAATT	GGATGAAGAC	TTAACTATTT	10050
ATATGAAAGA	TAAAGCATT	TCCCCAAAGA	AATCTAACTG	GGACACAGTC	10100
TATCCAGCTT	CAAACCTGTT	ATACCGCACT	AATGTGTCTC	ATGATTCAACG	10150
AAGATTGGTT	GAAGTATTTA	TAGCAGATAG	AAAATTGAT	CCCCACCAAG	10200
TATTAGATT	CGTAGAATCA	GGATATTGGC	TAGATGATCC	TGAATTTAAT	10250
ATCTCATATA	GTAAAGAAGA	GAAGAAATAA	AAACAAGAAG	GTAGACTTT	10300
TGCAAAATG	ACATACAAGA	TGAGAGCTAC	ACAAGTATTA	TCAGAAACAT	10350
TATTGGCGAA	TAATATAGGG	AAATTCTCC	AAGAGAATGG	GATGGTTAAA	10400
GGAGAAATTG	AATTACTCAA	GAGACTGACA	ACAATATCTA	TGTCTGGGT	10450
TCCGCGGTAT	AATGAGGTAT	ACAATAATTC	AAAAAGTCAC	ACAGAGGAAC	10500
TTCAAGCTTA	TAATGCAATT	AGCAGTTCCA	ATTTATCTTC	TAATCAGAAG	10550
TCAAAGAAGT	TTGAATTAA	ATCAACAGAT	ATATACAATG	ATGGATACGA	10600
AACCGTAAGC	TGCTCTTAA	CGACAGATCT	AAAAAAATAT	TGTTAAATT	10650
GGAGGTATGA	ATCAACAGCT	TTATTGGTG	ATACTGTAA	TCAGATATTT	10700
GGGTTAAAGG	AATTATTAA	TTGGCTGCAC	CCTCGCTTG	AAAAGAGTAC	10750
AATATATGTT	GGAGATCCTT	ATTGCCCGCC	ATCAGATATT	GAACATTAC	10800
CACTTGATGA	CCATCCTGAT	TCAGGATTT	ATGTTCATAA	TCCTAAAGGA	10850
GGAATAGAAG	GGTTTGCCA	AAAGTTATGG	ACACTCATAT	CTATCAGTGC	10900
CATACATT	GCAGCTGTCA	AAATCGGTGT	AAGAGTTACT	GCAATGGTC	10950
AAGGGATAA	TCAAGCCATA	GCTGTTACCA	CCAGAGTACC	TAATAATTAT	11000
GATTATAAGG	TTAAGAAAGA	GATTGTTTAT	AAAGATGTGG	TAAGATTTT	11050
TGATTCTTG	AGAGAGGTTA	TGGATGATCT	GGGTCAATGAG	CTCAAACATAA	11100
ATGAAACTAT	AATAAGTAGT	AAAATGTTA	TATATAGCAA	AAGGATATAC	11150
TATGACGGAA	GAATCCTTCC	TCAGGCGTTA	AAAGCATTGT	CTAGATGTGT	11200
TTTTGGTCT	GAAAACAATCA	TAGATGAGAC	AAGATCAGCA	TCCTCAAATC	11250
TGGCGACATC	GTTCGCAAAG	GCCATTGAGA	ATGGCTACTC	ACCTGTATTG	11300
GGATATGTAT	GCTCAATCTT	CAAAAATATC	CAACAGTTGT	ATATAGCACT	11350
TGGAATGAAT	ATAAATCCAA	CTATAACCCA	AAATATTTAA	GATCAATATT	11400
TCAGGAATAT	TCATTGGATG	CAATATGCAT	CTCTAATCCC	TGCTAGTGT	11450
GGAGGATTAA	ATTATATGGC	CATGTCAAGG	TGTTTGTCA	GAAACATTGG	11500
AGATCCTACA	GTCGCTGCAT	TAGCTGATAT	AAAAAGATT	ATAAAAGCAA	11550
ATTTGTTAGA	TCGAGGGTGT	CTTACAGAA	TTATGAATCA	GGAACCCAGGC	11600
GAGTCCTCCT	TTTAGACTG	GGCTTCAGAC	CCCTATTCTAT	GTAACCTACC	11650
ACAATCTCAA	AATATAACCA	CCATGATAAA	GAATATAACT	GCAAGAAATG	11700
TACTACAGGA	CTCACCAAAAC	CCATTACTAT	CTGGATTATT	TACAAGTACA	11750

FIG. 7E

ES 2 312 347 T3

ATGATAGAAG AGGATGAGGA ATTAGCTGAG TTCCATAATGG ACAGGAGAA	11800
AATTCTCCA AGGGTTCGC C ATGACATTT AGATAATTCT CTTACTGGAA	11850
TTAGGAATGC TATAGCTGGT ATGTTGGATA CAACAAAATC ACTAATTCGA	11900
GTAGGGATAA ACAGAGGAGG ATTAACCTAT AACTTATTA GAAAGATAAG	11950
CAACTATGAT CTTGTACAAT ATGAGACACT TAGTAAAAC TTAAGACTAA	12000
TAGTCAGTGA CAAGATTAAG TATGAAGATA TGTGCTCAGT AGACCTAGCC	12050
ATATCATTAA GACAAAAAAAT GTGGATGCAT TTATCAGGAG GAAGAATGAT	12100
AAATGGACTT GAAACTCCAG ATCCTTTAGA GTTACTGTCT GGAGTAATAA	12150
TAACAGGATC TGAGCATTGT AGGATATGTT ATTCAACTGA AGGTGAAAGC	12200
CCATATACAT GGATGTATT ACCAGGCAAT CTTAATATAG GATCAGCTGA	12250
AACAGGAATA GCATCATTAA GGGTCCCTA CTTTGGATCA GTTACGGATG	12300
AGAGATCTGA AGCACAATTG GGGTATATCA AAAATCTAAG CAAACCAGCT	12350
AAGGCTGCTA TAAGAATAGC AATGATATAT ACTTGGCAT TTGGGAATGA	12400
CGAAATATCT TGGATGGAAG CATCACAGAT TGCACAAACA CGTGCGAACT	12450
TTACATTAGA TAGCTAAAG ATTTGACAC CAGTGACAAC ATCAACAAAT	12500
CTATCACATA GGTTAAAAGA TACTGCTACT CAGATGAAAT TTTCTAGTAC	12550
ATCACTTATT AGAGTAAGCA GGTTCATCAC AATATCTAAT GATAATATGT	12600
CTATTAAAGA GGCAAATGAA ACTAAAGATA CAAATCTTAT TTATCAACAG	12650
GTAATGTTAA CAGGGTTAAG TGTATTTGAA TATCTATTTA GGTTAGAGGA	12700
GAGTACAGGA CATAACCCCTA TGGTCATGCA TCTACATATA GAGGATGGAT	12750
GTTGTATCAA AGAGAGTTAC AATGATGAGC ATATCAATCC GGAGTCTACA	12800
TTAGAGTTAA TTAAATACCC TGAGAGTAAT GAATTTATAT ATGATAAGGA	12850
CCCTTAAAG GATATAGATC TATCAAAATT AATGGTTATA AGAGATCATT	12900
CTTATACAAAT TGACATGAAT TACTGGGACG ACACAGATAT TGTACATGCA	12950
ATATCAATAT GTACTGCAGT TACAATAGCA GATACAATGT CGCAGCTAGA	13000
TCGGGATAAT CTTAAGGAGC TGGTTGTAAT TGCAAATGAT GATGATATTA	13050
ACAGTCTGAT AACTGAATT CTGACCCCTAG ATATACTAGT GTTCTCAAA	13100
ACATTTGGAG GTTACTCGT GAATCAATT GCATATACCC TTTATGGATT	13150
GAAAATAGAA GGAAGGGATC CCATTTGGGA TTATATAATG AGAACATTAA	13200
AAGACACCTC ACATTCAGTA CTTAAAGTAT TATCTAATGC ACTATCTCAT	13250
CCAAAAGTGT TTAAGAGATT TTGGGATTGT GGAGTTTGA ATCCTATTTA	13300
TGGCCTAAT ACTGCTAGTC AGGACCAAGT TAAGCTTGCT CTCTCAATT	13350
GCGAGTACTC CTTGGATCTA TTTATGAGAG AATGGCTGAA TGGAGCATCA	13400
CTTGAGATCT ATATCTGTGA TAGTGACATG GAAATAGCAA ATGATAGAAG	13450
ACAAGCATT CTCTCAAGAC ACCTTGCTT TGTGTGTTGT TTAGCAGAGA	13500
TAGCATCTT TGGACCAAAT TTATTAATC TAACATATCT AGAGAGACTT	13550
GACCAATTAA AACAACTACTT GGATCTGAAC ATCAAAGAAG ATCCTACTCT	13600
TAAATATGTG CAAGTATCAG GACTGTTAAT TAAATCATTC CCCTCAACTG	13650
TTACGTATGT GAGGAAAAC GCGATTAAGT ATCTGAGGAT TCGTGGCATT	13700
AATCCGCCTG AAACGATTGA AGATTGGGAT CCCATAGAAG ATGAGAATAT	13750
CTTAGACAAT ATTGTTAAA CTGTAATGA CAATTGCAGT GATAATCAA	13800
AGAGAAATAA AAGTAGTTAT TTCTGGGGAT TAGCTCTAAA GAATTATCAA	13850
GTCGTAAAAA TAAGATCCAT AACGAGTGTAT TCTGAAGTTA ATGAAGCTTC	13900
GAATGTTACT ACACATGGAA TGACACTTCC TCAGGGAGGA AGTTATCTAT	13950
CACATCAGCT GAGGTATTT GGAGTAAACA GTACAAGTTG TCTGAAAGCT	14000
CTTGAATTGT CACAAATTAA AATGAGGGAA GTTAAAAAAAG ATAAAGATAG	14050
ACTCTTTTA GGAGAAGGAG CAGGAGCTAT GTTAGCATGT TATGATGCTA	14100

FIG. 7F

ES 2 312 347 T3

CACTCGGTCC	TGCAATAAAT	TATTACAATT	CTGGTTAAA	TATTACAGAT	14150
GTAATTGGTC	AACGGGAATT	AAAAATCTTC	CCATCAGAAG	TATCATTAGT	14200
AGGTAAAAAA	CTAGGAAATG	TAACACAGAT	TCTTAATCGG	GTGAGGGGTGT	14250
TATTTAATGG	GAATCCAAT	TCAACATGGA	TAGGAAATAT	GGAATGTGAG	14300
AGTTTAATAT	GGAGTGAATT	AAATGATAAG	TCAATTGGTT	TAGTACATTG	14350
TGACATGGAG	GGAGCAATAG	GCAAATCAGA	AGAAAATGTT	TTACATGAAC	14400
ATTATAGTAT	TATTAGGATT	ACATATTAA	TTGGGGATGA	TGATGTTGTT	14450
CTAGTATCAA	AAATTATACC	AACTATTACT	CCGAATTGGT	CTAAAATACT	14500
CTATCTATAC	AGGTTGTATT	GGAAGGGATGT	GAGTGTAGTG	TCCCTTAAAAA	14550
CATCCAATCC	TGCCTCAACA	GAGCTTTATT	TAATTCAAA	GGATGCTTAC	14600
TGTACTGTAA	TGGAACCCAG	TAATCTTGT	TTATCAAAAC	TTAAAAGGAT	14650
ATCATCAGTA	GAAGAAAATA	ATCTATTAAA	ATGGATAATC	TTATCAAAAAA	14700
GGAAGAACAA	CGAATGGTTA	CAGCATGAAA	TCAAAGÄAGG	AGAAAGGGAT	14750
TATGGGATAA	TGAGGCCATA	TCATACAGCA	CTGCAAATT	TTGGATTCCA	14800
AATTAACCTA	AATCACTTAG	CTAAAGAATT	TTTATCAACT	CCTGATTAA	14850
CCAACATTAA	TAATATAATT	CAAAGTTTA	CAAGAACAAAT	TAAAGATGTT	14900
ATGTTCGAAT	GGGTCAATAT	CACTCATGAC	AATAAAAGAC	ATAAATTAGG	14950
AGGAAGATAT	AATCTATTCC	CGCTTAAAAA	TAAGGGGAAG	TTAAGATTAC	15000
TATCACGAAG	ATTAGTACTA	AGCTGGATAT	CATTATCTT	ATCAACCAGA	15050
TTACTGACAG	GCCGTTCCC	AGATGAAAAA	TTTAAAATA	GGGCACAGAC	15100
CGGATATGTA	TCATTGGCTG	ATACTGATT	AGAATCTTA	AAGTTATTAT	15150
CAAGAAATAT	TGTCAAAGT	TACAAAGAAC	ACATAGGATT	AATATCATA	15200
TGGTTTTAA	CCAAAGAGGT	CAAAATACTA	ATGAAACTTA	TAGGGGGAGT	15250
CAAACACTA	GGAATTCCC	AACAGTACAA	AGAGTTAGAG	GATCGATCAT	15300
TTCAGGGTTA	TGAATATGAT	AATGAATTG	ATATTGATTA	ATACATAAAA	15350
ACAAAAAAATA	AAACACCTAA	TCCTCTCCC	TTCACTTCCA	ACAAAATGAA	15400
AAGTAAGAAA	AACATATAAT	ATACATATAC	CAAACAGAGT	TTTTCTCTTG	15450
	TTTGGT				15456

FIG. 7G

ES 2 312 347 T3

Figura 8A

<i>rHPIV3</i>	[] N	P_{cov}	M	F	HN	<i>Bsi WI</i>	L
<i>rHPIV3-FBHNB</i>	[] N	P_{cov}	M	F	HN	<i>Bsi WI</i>	L
<i>rBPIV3-FHHNH</i>	[] N	P_{cov}	M	F	HN	<i>Bsi WI</i>	L
<i>BPIV3 KA</i>	[] N	P_{cov}	M	F	HN	<i>Bsi WI</i>	L

Figura 8B

Ensamblaje de un cDNA antigenómico para BPIV3 Ka

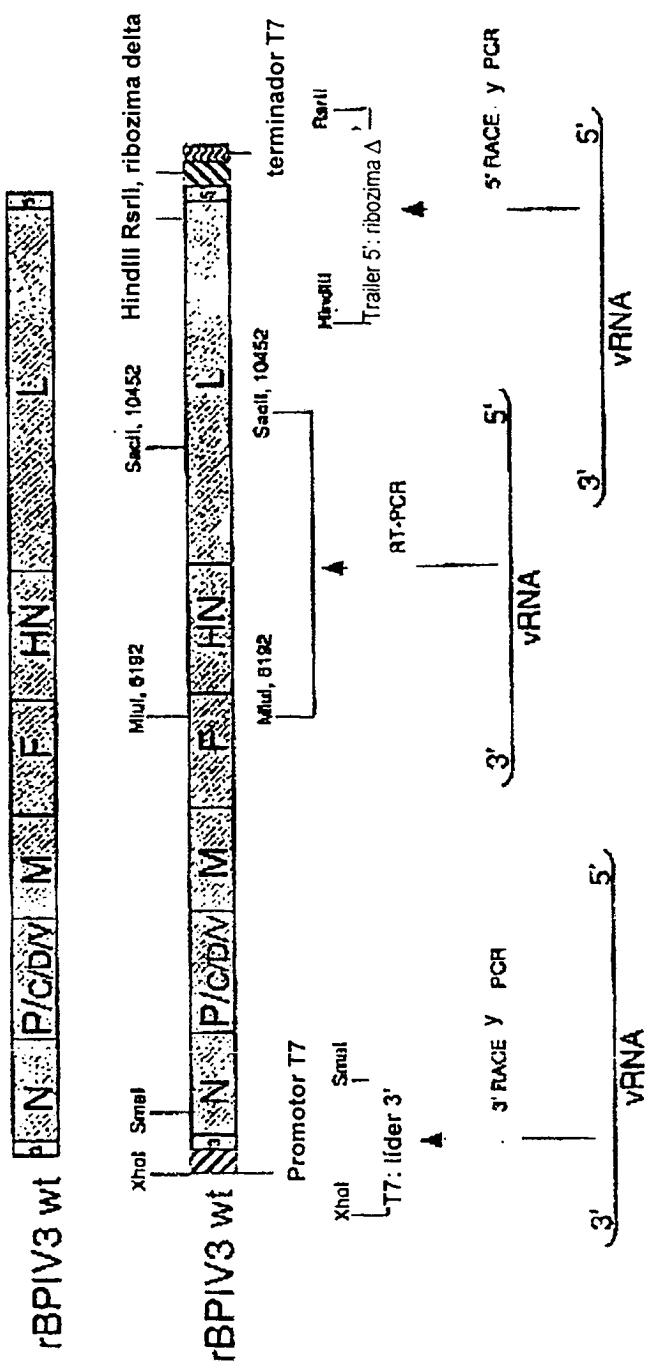


Figura 8C

Generación de clones de cDNA de longitud completa que codifican virus antígenicos HPIV3/BPIV3 químéricos

1. Generación de clones de longitud completa de HPIV3 y BPIV3



2. Mutagénesis para crear sitios de restricción SgrAI y BsiWI únicos



3. Clonación de los genes F y HN en el cDNA heterólogo de longitud completa

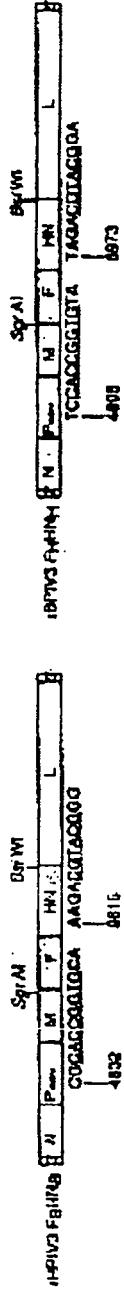


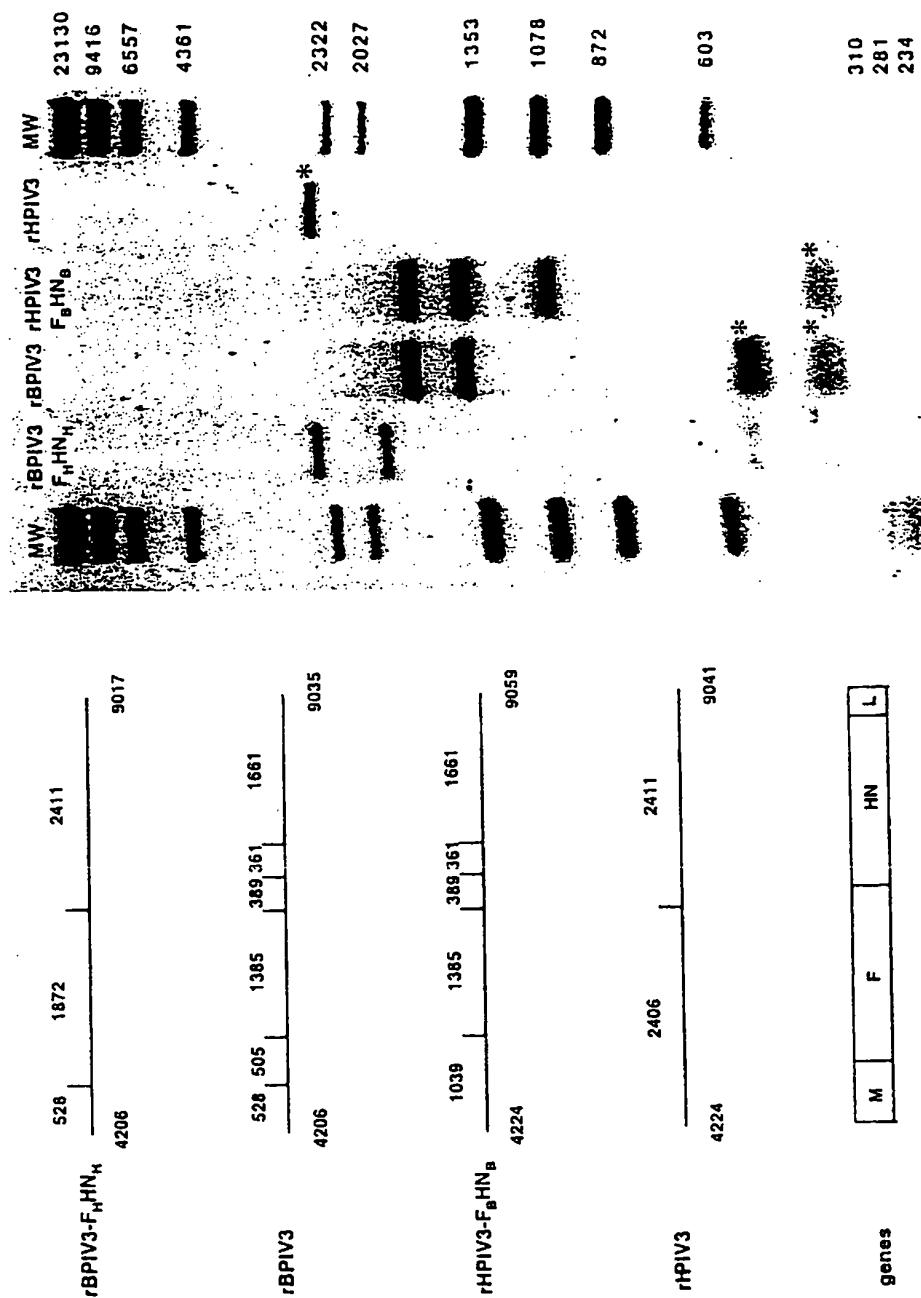
Figura 9

Figura 10

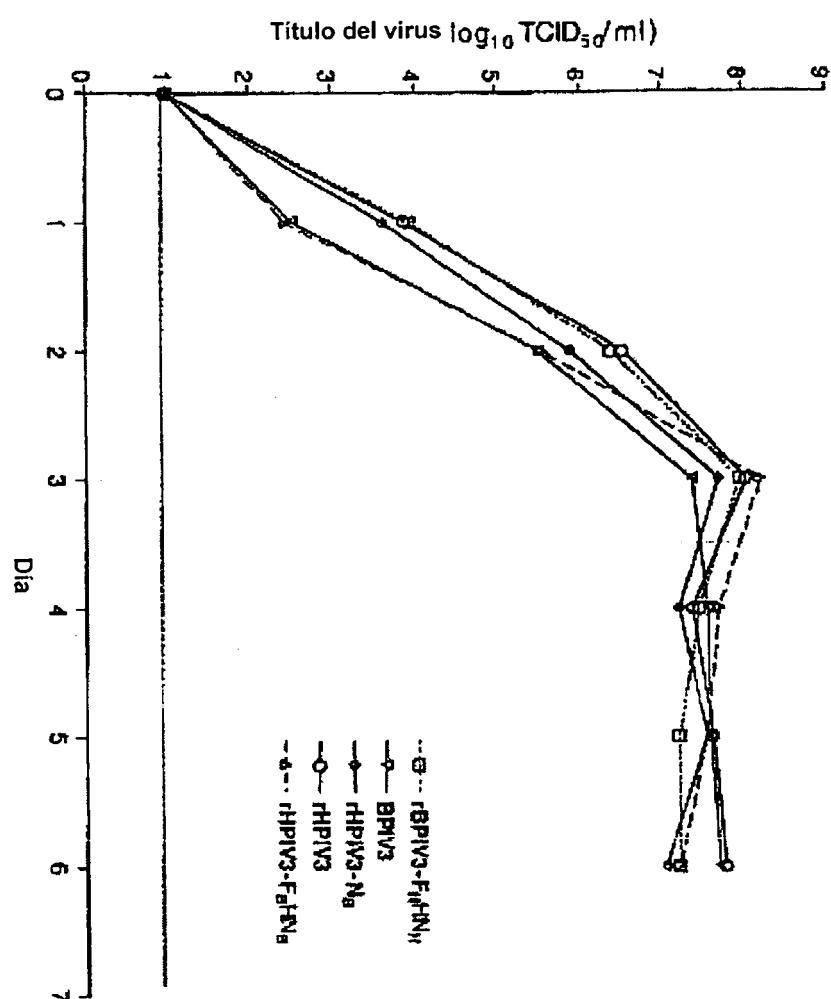
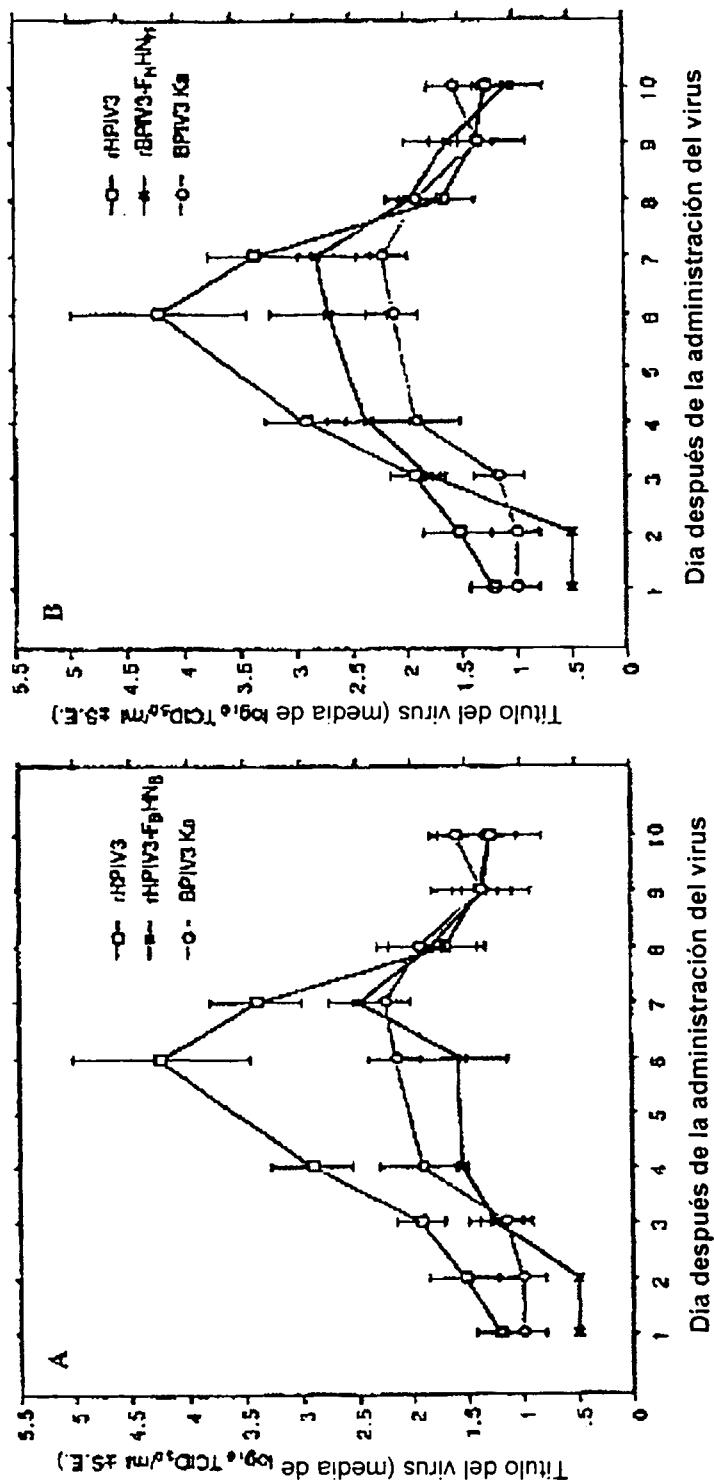


Figura 11



LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, como

5 <120> VACUNAS ATENUADAS QUIMÉRICAS HUMANO-BOVINO DEL VIRUS PARAINFLUENZA (PIV)

<130> 15280-399100PC

10 <140>

<141>

15 <150> 60/143,134

<151> 1999-07-09

<160> 31

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 7

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Lugares de secuencias flanqueantes de polimorfismo de secuencia en BPIV3 KA

35 <400> 1

actggtt

7

40 <210> 2

<211> 12

<212> ADN

45 <213>

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para introducción de rBPIV3 Ka por el lugar Sgr Al

<400> 2

55

tccaaacattg ca

12

60 <211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para introducción de rHPIV3 s por el lugar de Sgr Al

ES 2 312 347 T3

<400> 3

tccaccggtg ca

12

5

<210> 4

<211> 12

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para la introducción de rHPIV3 JS por el lugar de Sgr Al

20 <400> 4

tccaccggtg ca

12

25 <210> 5

<211> 12

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para la introducción de rHPIV3 s por el lugar de Sgr Al

<400> 5

40 **cgcaccggtg ta**

12

<210> 6

45 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para la introducción de rBPIV3 Ka por el lugar de Bsi WI

55 <400> 6

gatataaaga

10

60

<210> 7

<211> 10

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 312 347 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Luagar de flanqueo de secuencia para la introducción de rBPIV3 s por el lugar de Bsi WI

5 <400> 7

gacgtacgga

10

10

<210> 8

<211> 10

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para la introducción de rHPIV3 JS por el lugar de Bsi WI

25 <400> 8

gacaaaaaggg

10

30 <210> 9

<211> 10

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de flanqueo de secuencia para la introducción de rHPIV3 s por el lugar de Bsi WI

<400> 9

45 **gacgtacggg**

10

<210> 10

50 <211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Codón de inicio del flanqueo de secuencia del gen N

60 <400> 10

caaaaaatgtt g

11

65 <210> 11

<211> 12

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Codón de parada del flanqueo de secuencia del gen N
 10 <400> 11

	gcaactaatac ga	12
--	-----------------------	-----------

15 <210> 12
 <211> 12
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de restricción introducido en secuencia flanqueante en el codón de inicio del gen N
 <400> 12

	taaccatggta gta	12
--	------------------------	-----------

30 <210> 13
 35 <211> 12
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Lugar de restricción introducido en secuencia flanqueante en el codón de parada del gen N
 <400> 13

	gcacttaaagc ac	12
--	-----------------------	-----------

50 <210> 14
 <211> 12
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Mutación de secuencia flanqueante para establecer contexto para el codón de inicio del gen N

ES 2 312 347 T3

<400> 14

caaaaatgtt ga

12

5

<210> 15

<211> 12

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Mutación de secuencia flanqueante para establecer contexto para el codón de parada del gen N

20 <400> 15

gcaactagtc ga

12

25 <210> 16

<211> 40

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia flanqueante del codón de inicio del gen N en rJS

35

<400> 16

ggaactctat aatttcaaaa atgttgagcc tatttgatac

40

40

<210> 17

<211> 40

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia flanqueante del codón de inicio del gen N en cKa y cSF

<400> 17

55

ggaactctat aatttcaaaa atgttgagtc tattcgacac

40

60 <210> 18

<211> 40

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 312 347 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia flanqueante del codón de inicio del gen N en Ka y SF

5 <400> 18

gaaatcctaa gactgtatac atgttgagtc tattcgacac

40

10 <210> 19

<211> 40

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia flanqueante del codón de parada del gen N en rJS

<400> 19

25 **ttaacgcatt tggaaagcaac taatcgaatc aacattttaa**

40

<210> 20

<211> 40

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia flanqueante del codón de parada del gen N en cKa y cSF

40 <400> 20

tcagtgcatt cgaaagcaac tagtcgaatc aacattttaa

40

45 <210> 21

<211> 40

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia flanqueante del codón de parada del gen N en Ka y SF

55 <400> 21

tcagtgcatt cgaaagcaac tagtcacaaa gagatgacca

40

60 <210> 22

<211> 15456

65 <212> ADN

<213> Virus Parainfluenza 3 bovina (cepa Ka)

ES 2 312 347 T3

<400> 22

5 accaaacaag agaagagact ggtttggaa tattaattca aataaaaatt aacttaggat 60
 taaagaacctt taccgaaagg taagggaaa gaaatctaa gactgtatc atgttgagtc 120
 tattcgacac attcagtgcg cgtaggcagg agaacataac gaaatcagct ggtggggctg 180
 ttattcccg gcaaaaaaac actgtgtcta tatttgcctt tggaccatca ataacagatg 240
10 acaatgataa aatgacattg gctcttctct ttttgcctca ttcttttagac aatgaaaagc 300
 agcatgcgca aagagctgga ttttagttt ctctgttatac aatggcttat gccaaacccag 360
 aattatattt aacatcaaata ggttagtaatg cagatgttaa atatgttatac tacatgatag 420
 agaaagaccc aggaagacag aaatatggt ggtttgtcgt caagactaga gagatggttt 480
15 atgaaaagac aactgatgg atgttcggga gtgatcttga gtatgtcaa gacaatatgt 540
 tgcaaaatgg tagaagcact tctacaatcg aggatcttgt tcatactttt ggatatccat 600
 cgtgtcttgg agcccttata atccaagttt ggataatact tggtaaggct ataaccagta 660
 ttcaggatt gaggaaagga ttctttactc gggttagaagc atttcgacaa gatggaacag 720
20 ttaaatccag tctagtgtt ggcgtgtatc cagtagaaaca aattggatca attatgaggt 780
 cccaaacagag cttggtaaca ctcatggttt aaacactgtat aacaatgaac acaggcagga 840
 atgatctgac aacaatagaa aagaatatac agattgttagg aaactacatc agagatgcag 900
 gtcttgcttc attttcaac acaatcagat atggcattga gactagaatg gcagctctaa 960
25 ctctgtctac ctttagaccg gatataaca gactcaaggc actgtatcgat ttatatctat 1020
 caaaggggcc acgtgtccct tttatatgc ttttgagaga tccccgtgcattt ggtgagttt 1080
 caccaggcaa ctatcctgcc ctctggagtt atgcgtatgg tggtagcagtt gtacaaaaca 1140
 aggcctatgca acagtatgtt acaggaaggt cttatcttga tattgaaatg ttccaaactt 1200
30 gtcaagcagt ggcacgtgtat gcccgtgcg agatgagttc aatatttagag gatgaactgg 1260
 gggtcacaca agaagccaag caaagcttga agaaacacat gaagaacatc agcagttcag 1320
 atacaacctt tcataaggctt acagggggat cagccataga aatggcgata gatgaagaag 1380
 cagggcagcc tgaatccaga ggagatcagg atcaaggaga tgagcctcgg tcatccatag 1440
35 ttccttatgc atggcagac gaaaccggga atgacaatca aactgaatca actacagaaa 1500

40

45

50

55

60

65

ES 2 312 347 T3

ttgacagcat caaaactgaa caaagaaaaca tcagagacag gctgaacaaa agactcaacg 1560
agaaaaggaa acagagtgc ccgagatcaa ctgacatcac aaacaacaca aatcaaactg 1620
aaatagatga ttgttcagt gcattcgaa gcaactagtc acaaagagat gaccactatc 1680
accagcaaca agtaagaaaa acttaggatt aatggaaatt atccaatcca gagacggaag 1740
gacaaatcca gaatccaacc acaactcaat caaccaaaga ttcatggaag acaatgttca 1800
aaacaatcaa atcatggatt cttggaaaga gggatcagga gataaatcat ctgacatctc 1860
atcggccctc gacatcattt aattcatact cagcaccgac tcccagaga acacggcaga 1920
cagcaatgaa atcaacacag gaaccacaag acttagcag acaatctacc aacctgaatc 1980
caaaacaaca gaaacaagca aggaaaatag tggaccagct aacaaaaatc gacagtttg 2040
ggcatcacac gaacgtgcca cagagacaaa agatagaaat gttaatcagg agactgtaca 2100
gggaggatat aggagaggaa gcagcccaga tagtagaact gagactatgg tcactcgaag 2160
aatctccaga agcagccccag atcctaaca tgaacccaa atccaggaag atattgatta 2220
caatgaagtt ggagagatgg ataaggactc tactaagagg gaaatgcgac aattttaaaga 2280
tgttccagtc aaggtatcag gaagtgtgc cattcctcca acaaaacaag atggagacgg 2340
tcatgtgga agaggcctgg aatctatcag tacatttgat tcaggatata ccagtatagt 2400
gactgccgca acactagatg acgaagaaga actcctttag aagaacaaca ggccaagaaa 2460
gtatcaatca acaccccaaga acagtgcacaa gggattaaa aaaggggttg gaaggccaaa 2520
agacacagac aaacaatcat caatattgga ctacgaactc aacttcaaag gatcgaagaaa 2580
gagccagaaa atcctcaaag ccagcacgaa tacaggagaa ccaacaagac cacagaatgg 2640
atcccagggg aagagaatca catcctggaa catcctcaac agcgagagcg gcaatcgaac 2700
agaatcaaca aaccaaaccatc acagacatc aacctcgggc cagaaccaca caatgggacc 2760
aagcagaaca acctccgaac caaggatcaa gacacaaaaag acggatggaa aggaaaagaga 2820
ggacacagaa gagagcactc gatttacaga aagggcgatt acattattac agaatcttg 2880
tgtaatccaa tctgcagcaa aatttagacct ataccaagac aagagatgg tttgtgtggc 2940
gaatgtccaa aacaatgcag atactgcac aacatgatc ttcctagcag gtttgatgat 3000
aggagtgtca atggatcatg ataccaaatt aaatcagatt cagaacgaga tattaagttt 3060
gaaaactgtat ctaaaaaaga tggatgaatc acatagaaga ctaattgaga atcaaaaaaga 3120
acaattatca ctgatcacaat cattaatctc aaatcttaaa attatgacag agagaggagg 3180
gaagaaggac caaccagaac ctacggggag gacatccatg atcaagacaa aagaaaaaaa 3240
agagaaaata aagaaaagtca gtttgcaccc tcttatggaa acacaggcga tcgagaaaaaa 3300
catccctgac ctctatagat caatagagaa aacaccagaa aacgacacac agatcaaatc 3360
agaaaataaac agattgaatg atgaatccaa tgccactaga ttagtaccta gaagaataag 3420
cagtacaatg agatcattaa taataatcat taacaacagc aatttacat caaaagcaaa 3480
gcaatcatac atcaacgaac tcaagctctg caagagtgc gaggaagtgt ctgagttgt 3540
ggacatgttc aatgaggatg tcagctccaa gtaaaaccgc aaccaagggt caacaccaag 3600
aaaaccaata gcacaaaaca gccaatcaga gaccacccca atacacccaa ccaatcaaca 3660
cataacaaag atctccagat catagatgat taagaaaaac ttaggatgaa aggactaatc 3720
aatcctccga aacaatgagc atcacaact ccacaatcta cacattccaa gaatccttt 3780
tctccgagaa tggcaacata gagccgttac cactcaaggt caatgaacag agaaaggcga 3840
tacctcatat tagggttgc aagataggag atccgccccaa acatggatcc agatatctgg 3900
atgtctttt actgggcttc tttgagatgg aaaggtcaaa agacaggtat gggagcataa 3960
gtgatctaga tcatgtatcca agttacaagg tttgtggctc tggatcattt ccacttgggt 4020
tggctagata caccggaaat gatcaggaac tcctacaggc tgcaaccaag ctgcataatc 4080
aagtaagaag aactgtaaag gctacggaga tgatagttt cactgtacaa aacatcaac 4140
ctgaactata tccatggtcc agtagattaa gaaaaggat gttatttgc gctaataagg 4200
ttgcacttgc tcctcaatgt cttccactag atagaggat aaaatcagg gtgatattt 4260
tgaactgcac agcaattgga tcaataactc tattcaaaat ccctaagtcc atggcattt 4320
tatcattgccc taatacaata tcaataaaatc tacaagtaca tatcaaaaaca ggagttcaga 4380