



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 370**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01986054 .3**
(86) Fecha de presentación : **28.11.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1480671**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

(54) Título: **Sistemas de expresión de virus RSV recombinantes y vacunas.**

(30) Prioridad: **28.11.2000 US 724416**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **MedImmune Vaccines, Inc.**
297 North Bernardo Avenue
Mountain View, California 94043, US

(72) Inventor/es: **Jin, Hong;**
Tang, Roderick;
Li, Shengqiang y
Bryant, Martin

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

ES 2 291 370 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

Sistemas de expresión de virus RSV recombinantes y vacunas.

5 1. Introducción

El presente invento se refiere a moldes de RNA de virus recombinantes de cadena negativa, que pueden ser usados para que se expresen productos génicos heterólogos en sistemas de células huésped apropiados y/o para construir virus recombinantes que expresen, empaqueten y/o presenten el producto génico heterólogo. Los productos de expresión y los virus quiméricos pueden ser ventajosamente usados en formulaciones de vacunas. En particular, el presente invento se refiere a métodos para generar virus respiratorios sincitiales recombinantes y al uso de estos virus recombinantes como vectores de expresión y vacunas. El invento se describe por medio de ejemplos en que se usan genomas víricos respiratorios sincitiales recombinantes para generar partículas víricas infecciosas.

15 2. Antecedentes del invento

Se han construido genéticamente diversos virus DNA para dirigir la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de células huésped (por ejemplo, virus vaccinia, baculovirus, etc.). Recientemente, se han realizado progresos similares con virus RNA de cadena positiva (por ejemplo, poliovirus). Se piensa que los productos de expresión de estas construcciones, es decir, el producto génico heterólogo o el virus quimérico que expresa el producto génico heterólogo, son potencialmente útiles en formulaciones de vacunas (sean vacunas de subunidad viral o sean vacunas de virus completo). Un inconveniente del uso de virus tales como el virus vaccinia para construir virus recombinantes o quiméricos para uso en vacunas es la falta de variación en sus epítomos principales. Esta falta de variabilidad en las cepas virales introduce serias limitaciones al uso repetido de virus vaccinia quimérico ya que múltiples vacunaciones generarán la resistencia del huésped a la cepa, con lo que el virus inoculado no podrá infectar al huésped. Por lo tanto, la inoculación de un virus vaccinia quimérico a un individuo resistente no provocará una estimulación inmune.

Por contraste, los virus RNA de cadena negativa, tales como el influenzavirus y el virus respiratorio sincitial, presentan una gran variabilidad en sus epítomos principales. En realidad, se han identificado miles de variantes de influenzavirus, generándose cada cepa por deriva antigénica. Los virus de cadena negativa tales como el influenzavirus y el virus respiratorio sincitial serían unos candidatos atractivos para construir virus quiméricos para uso en vacunas ya que su variabilidad genética permite la construcción de un vasto repertorio de formulaciones de vacunas que estimularán la inmunidad sin riesgo de que se desarrolle una tolerancia.

35 2.1 Virus respiratorio sincitial

Las familias de virus que contienen RNA envuelto de cadena sencilla del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae) y aquellos que tienen genomas segmentados (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae y Arenaviridae). Los Paramyxoviridae han sido clasificados en tres géneros: Paramyxovirus (virus Sendai, parainfluenzavirus de tipos 1-4, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle), Morbillivirus (virus del sarampión, virus del moquillo canino y virus de la peste bovina) y Pneumovirus (virus respiratorio sincitial y virus respiratorio sincitial bovino).

El virus respiratorio sincitial (RSV; del inglés, respiratory syncytial virus) humano es la causa primera de enfermedad grave del tracto respiratorio inferior en infantes y niños pequeños y es responsable de una morbilidad y una mortalidad considerables. En las poblaciones humanas están presentes dos subgrupos de RSV antigénicamente diferentes, A y B. El RSV es también reconocido como un importante agente de enfermedad en adultos inmunocomprometidos y en la gente mayor. A causa de la resistencia incompleta a la reinfección por RSV inducida por infección natural, el RSV puede infectar múltiples veces durante la niñez y durante toda la vida. La finalidad de la inmunoprophilaxis con RSV es provocar la resistencia suficiente para evitar la enfermedad grave que puede estar asociada con la infección por RSV. Las estrategias actuales para desarrollar vacunas de RSV giran principalmente en torno a la administración de antígeno viral purificado o al desarrollo de RSV atenuado vivo para administración intranasal. Sin embargo, hasta la fecha no ha habido vacunas aprobadas ni una terapia antiviral muy eficaz para el RSV.

La infección con RSV puede variar de una infección imperceptible a una neumonía grave y la muerte. El RSV posee un genoma de RNA de sentido negativo, no segmentado y de cadena sencilla, de 15.221 nucleótidos (Collins, 1991, en "The paramyxoviruses", páginas 103-162, compilado por D. W. Kingsbury, Plenum Press, New York, EE.UU.). El genoma del RSV codifica 10 mRNAs (Collins *et al.*, 1984, J. Virol. 49: 572-578). El genoma contiene una secuencia líder de 44 nucleótidos en los extremos 3' seguida de NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L, y una secuencia remolque de 155 nucleótidos en los extremos 5' (Collins, 1991, *supra*). Cada unidad de transcripción génica contiene un tramo corto de secuencia conservada de inicio de gen (GS; del inglés, gene start) y unas secuencias de fin de gen (GE; del inglés, gene end).

El RNA genómico viral no es infeccioso como RNA desnudo. El genoma de RNA del RSV está estrechamente encapsidado por la proteína principal de la nucleocápsida (N) y está asociado con la fosfoproteína (P; del inglés, phosphoprotein) y la subunidad grande (L; del inglés, large) de la polimerasa. Estas proteínas forman el corazón de la nucleoproteína, que es reconocida como la unidad mínima de infectividad (Brown *et al.*, 1967, J. Virol. 1: 368-373). Las proteínas N, P y L del RSV forman la RNA transcriptasa viral dependiente de RNA, para la transcripción

y replicación del genoma del RSV (Yu *et al.*, 1995, J. Virol. 69: 2412-2419; Grosfeld *et al.*, 1995, J. Virol. 69: 5677-86). Estudios recientes indican que los productos del gen M2 (M2-1 y M2-2) están implicados en la transcripción y son necesarios para ella (Collins *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 81-5).

La proteína M se expresa como una proteína periférica de membrana, mientras que las proteínas F y G se expresan como proteínas integrales de membrana y están implicadas en la fijación del virus a las células y en la entrada vírica en las células. Las proteínas G y F son los principales antígenos que generan anticuerpos neutralizantes *in vivo* [como revisan McIntosh y Chanock, 1990, "Respiratory Syncytial Virus", 2ª edición de "Virology" (compilado por D. M. Knipe *et al.*), Raven Press, Ltd., New York, EE.UU.]. El dimorfismo antigénico entre los subgrupos A y B de RSV está principalmente ligado a la glicoproteína G, mientras que la glicoproteína F está más estrechamente relacionada entre los subgrupos.

A pesar de décadas de investigación, no se ha desarrollado una vacuna segura y eficaz de RSV para la prevención de la morbilidad y la mortalidad graves asociadas con la infección por RSV. Una vacuna de virus inactivado con formol no logró proporcionar protección contra la infección por RSV ni sus síntomas exacerbados durante la subsiguiente infección por el virus de tipo silvestre en infantes (Kapikian *et al.*, 1969, Am. J. Epidemiol. 89: 405-21; Chin *et al.*, 1969, Am. J. Epidemiol. 89: 449-63). Desde entonces, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de mutantes vivos atenuados, sensibles a la temperatura, por mutagénesis química o por pases del RSV de tipo silvestre en frío (Gharpure *et al.*, 1969, J. Virol. 3: 414-21; Crowe *et al.*, 1994, Vaccine 12: 691-9). Sin embargo, los ensayos previos produjeron unos resultados desalentadores con estos mutantes vivos, atenuados y sensibles a la temperatura. Los candidatos víricos estaban infraatenuados o sobreatenuados (Kim *et al.*, 1973, Pediatrics 52: 56-63; Wright *et al.*, 1976, J. Pediatrics 88: 931-6) y algunos de los candidatos a vacuna resultaron genéticamente inestables, lo que daba lugar a la pérdida del fenotipo atenuado (Hodes *et al.*, 1974, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1158-64).

También se han realizado intentos para construir vectores recombinantes de virus vaccinia que expresen la glicoproteína F o G de envoltura de RSV. Sin embargo, en estudios con animales, el uso de estos vectores como vacunas para proteger frente a una infección por RSV ha mostrado unos resultados inconsistentes (Olmsted *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 7462-7466; Collins *et al.*, 1990, Vaccine 8: 164-168).

Por consiguiente, los esfuerzos han virado hacia la construcción de RSV recombinantes para generar vacunas. Durante mucho tiempo, los virus RNA de sentido negativo resultaron refractarios al estudio. Sólo recientemente ha sido posible recuperar virus RNA de cadena negativa utilizando un planteamiento de genética inversa recombinante (Patente de EE.UU. nº 5.166.057, concedida a Palese *et al.*). Aunque este método fue aplicado originalmente a construir genomas de influenzavirus (Luytjes *et al.*, 1989, Cell 59: 1107-1113; Enami *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11.563-11.567), ha sido exitosamente aplicado a una gran variedad de virus RNA segmentados y no segmentados de cadena negativa, incluyendo el virus de la rabia (Schnell *et al.*, 1994, EMBO J. 13: 4195-4203), VSV (Lawson *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-81), el virus del sarampión (Radecke *et al.*, 1995, EMBO J. 14: 5773-84), el virus de la peste bovina (Baron y Barrett, 1997, J. Virol. 71: 1265-71), parainfluenzavirus humano (Hoffman y Banerjee, 1997, J. Virol. 71: 3272-7; Dubin *et al.*, 1997, Virology 235: 323-32), SV5 (He *et al.*, 1997, Virology 237: 249-60), el virus respiratorio sincitial (Collins *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9663-9667) y el virus Sendai (Park *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5537-5541; Kato *et al.*, 1996, Genes to Cells 1: 569-579). Aunque este planteamiento ha sido utilizado para rescatar RSV exitosamente, diversos grupos han comunicado que el RSV es aún refractario para estudiar diversas propiedades dadas del RSV que le distinguen de los paramixovirus mejor caracterizados de los géneros Paramyxovirus, Rubulavirus y Morbillivirus. Estas diferencias incluyen un mayor número de RNAs, un orden génico poco frecuente en el extremo 3' del genoma, una amplia diversidad de secuencias de cepa a cepa, diversas proteínas no halladas en otros virus RNA no segmentados de cadena negativa, y la necesidad de que la proteína M2 (ORF1) prosiga el procesamiento completo de los transcritos de longitud completa y el rescate de un genoma de longitud completa (Collins *et al.*, PCT WO97/12032; P. L. Collins *et al.*, páginas 1313-1357 del volumen 1 de *Fields Virology*, 3ª edición, Raven Press, 1996).

3. Sumario del invento

El presente invento se refiere a virus RS recombinantes, genéticamente contruidos, y a vectores víricos que contienen genes heterólogos para uso como vacunas. De acuerdo con el presente invento, los virus y vectores víricos RS recombinantes se construyen para que contengan genes heterólogos, incluyendo genes de otros virus, patógenos, genes celulares y antígenos tumorales, o para que codifiquen combinaciones de genes de diferentes cepas de RSV.

El presente invento, en un primer aspecto, proporciona una partícula infecciosa aislada de virus respiratorio sincitial que tiene un fenotipo atenuado que comprende un genoma o antigenoma de virus respiratorio sincitial, en que dicho genoma o antigenoma tiene: (a) una secuencia heteróloga que codifica unas proteínas G y F, de la cepa B9320 de RSV; y (b) una delección del marco de lectura abierto M2-2.

Se describen moldes de RNA vírico recombinante de cadena negativa que pueden ser utilizados para transfectar células transformadas que expresan la RNA polimerasa dependiente de RNA y permiten la complementación. Alternativamente, se puede utilizar un plásmido que expresa los componentes de la RNA polimerasa a partir de un promotor apropiado, para transfectar células con objeto de permitir la complementación de los moldes de RNA vírico de cadena negativa. La complementación puede ser también llevada a cabo con el uso de un virus auxiliar o un virus de tipo silvestre que proporcione la RNA polimerasa dependiente de RNA. Los moldes de RNA son preparados mediante la

transcripción de secuencias de DNA apropiadas con una RNA polimerasa dirigida por DNA. Los moldes de RNA resultantes tienen polaridad negativa o positiva y contienen secuencias terminales apropiadas que permiten que el aparato sintetizador de RNA viral reconozca el molde. Se pueden construir mRNAs bicistronicos para permitir la iniciación interna de la traducción de secuencias víricas y permitir la expresión de secuencias codificadoras de proteínas extrañas a partir del sitio de iniciación terminal normal, o viceversa.

Como se demuestra mediante los ejemplos aquí descritos, el genoma de RSV recombinante, en orientación de sentido positivo o sentido negativo, es cotransfectado con vectores de expresión que codifican la proteína de la nucleocápsida viral (N), la fosfoproteína (P) asociada de la nucleocápsida y la proteína de la subunidad grande (L) de la polimerasa, con o sin la proteína M2/ORF1 de RSV, para generar partículas víricas infecciosas. Como fuente de proteínas que son capaces de replicar y transcribir RNPs sintéticamente derivadas, se usan plásmidos que codifican polipéptidos de virus RS. Se halló que el subconjunto mínimo de proteínas de RSV necesarias para la replicación y expresión específicas de la RNP vírica lo componían las tres proteínas del complejo de polimerasa (N, P y L). Esto sugiere que puede que no sea absolutamente necesaria la función completa del gen M2-1, proporcionada por un plásmido distinto que expresa M2-1, para la replicación, la expresión y el rescate del RSV infeccioso.

Los productos de expresión y/o viriones quiméricos obtenidos pueden ser ventajosamente utilizados en formulaciones de vacunas. En particular, como vacuna viva de RSV, se puede utilizar un RSV recombinante genéticamente construido para que presente un fenotipo atenuado. De acuerdo con el invento, se construyen RSVs recombinantes para que expresen los polipéptidos G y F heterólogos de la cepa B9320 de RSV, para generar un RSV quimérico que sirva como vacuna, que sea capaz de provocar en vertebrados tanto una respuesta inmune humoral como una respuesta inmune celularmente mediada. El uso del RSV recombinante para este fin es especialmente atractivo ya que estos virus presentan una extraordinaria variabilidad de cepas, lo que permite la construcción de un vasto repertorio de formulaciones de vacunas. La capacidad para seleccionar entre miles de variantes virales a la hora de construir virus quiméricos evita el problema de la resistencia del huésped al que hay que enfrentarse cuando se usan otros virus, tales como los virus vaccinia.

El presente invento se refiere además a la atenuación del virus respiratorio sincitial humano por delección del marco de lectura abierto M2-2.

3.1 Definiciones

Como se usan aquí, los términos siguientes tienen los significados indicados:

cRNA = RNA antigenómico

HA = hemaglutinina (glicoproteína de la envoltura)

VIH = virus de la inmunodeficiencia humana

L = subunidad grande de la polimerasa

M = proteína matricial (líneas dentro de la envoltura)

MDCK (del inglés; Madin-Darby canine kidney) = células renales caninas Madin-Darby

MDBK (del inglés; Madin-Darby bovine kidney) = células renales bovinas Madin-Darby

moi = multiplicidad de infección

N = proteína de la nucleocápsida

NA = neuraminidasa (glicoproteína de la envoltura)

NP = nucleoproteína (asociada con RNA y necesaria para la actividad polimerasa)

NS (del inglés, nonstructural) = proteína no estructural (función desconocida)

nt = nucleótido

P = fosfoproteína de la nucleocápsida

PA, PB1, PB2 = componentes de la RNA polimerasa dirigida por RNA

RNP = ribonucleoproteína (RNA, PB2, PB1, PA y NP)

rRNP = RNP recombinante

RSV = virus respiratorio sincitial

vRNA = RNA viral genómico

5 Complejo de la polimerasa vírica = PA, PB1, PB2 y NP

WSN = influenzavirus A/WSN/33

10 Virus WSN-HK = virus de reclasificación que contiene siete genes del virus WSN y el gen NA del influenzavirus A/HK/8/68

4. Descripción de las figuras

15 Figura 1. Representación esquemática de la construcción RSV/CAT (pRSVA2CAT) usada en experimentos de rescate. Se construyeron las regiones líder de aproximadamente 100 nt de longitud y remolque de aproximadamente 200 nt de longitud de RSV, mediante la hibridación controlada de oligonucleótidos sintéticos que contienen complementariedad solapante parcial. Los oligonucleótidos líder solapantes se indican mediante las 1L - 5L mostradas en la construcción. Los oligonucleótidos remolque solapantes se indican mediante las 1T - 9T mostradas en la construcción. Las secuencias de nucleótidos de los DNAs líder y remolque fueron ligadas al DNA purificado del gen CAT, respectivamente en los sitios XbaI y PstI indicados. Esta construcción entera fue luego ligada a pUC19 sometido a digestión con KpnI/HindIII. La inclusión de una secuencia del promotor de T7 y un sitio HgaI que flanqueaba las secuencias remolque y líder, respectivamente, permitió la síntesis *in vitro* de transcritos de RNA de RSV/CAT que contenían los extremos 3' y 5' exactos de la secuencia genómica.

25 Figura 2. Cromatograma en capa fina (TLC; del inglés, thin layer chromatogram) que muestra la actividad CAT presente en extractos de células 293 después de la infección y transfección con RNA transcrito a partir de la construcción RSV/CAT mostrada en la Figura 11. Se infectaron monocapas confluentes de células 293, en placas de seis pocillos (~10⁶ células), con RSV A2 o B9320, con una moi de 0,1-1,0 unidades formadoras de placa (pfu; del inglés, plaque forming unit)/célula. 1 hora después de la infección, se transfectaron las células con 5-10 µg de CAT/RSV usando el protocolo Transfect-Act™ de Life Technologies. 24 horas después de la infección, las monocapas infectadas/transfectadas fueron recolectadas y fueron procesadas para el subsiguiente ensayo de CAT de acuerdo con "Current Protocols in Molecular Biology", Volumen 1, Capítulo 9.6.2.; Gorman *et al.* (1982), Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051. Los carriles 1, 2, 3 y 4 muestran la actividad CAT presente en (1) células 293 no infectadas, transfectadas con RNA de CAT/RSV, (2) células 293 infectadas con RSV-A2, transfectadas con RNA de CAT/RSV, (3) células 293 infectadas con RSV-B9320, transfectadas con RNA de CAT/RSV, y (4) células 293 infectadas con RSV-A2, coinfectadas con el sobrenadante de las células (2) anteriores. La actividad CAT observada en cada carril fue producida por 1/5 del extracto celular total de 10⁶ células.

40 Figura 3. Representación esquemática del genoma de la cepa A2 de RSV, que muestra las posiciones relativas de las parejas de cebadores utilizadas para la síntesis de cDNAs que comprenden el genoma entero. Se indican los sitios de endonucleasas utilizados para cortar y empalmar estos clones juntos; estos sitios estaban presentes en la secuencia nativa de RSV y fueron incluidos en los cebadores usados para la síntesis de cDNA. Para la síntesis separada de cada uno de los siete cDNAs, se utilizaron aproximadamente 100 ng de RNA genómico viral en reacciones de transcripción inversa/reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR; del inglés, reverse transcription/polymerase chain reaction). También se muestran los cebadores para la síntesis de las cadenas primera y segunda del cDNA a partir del molde de RNA genómico. Para cada cDNA, los cebadores para la síntesis de la primera cadena son los números 1-7 y los cebadores para la síntesis de la segunda cadena son los números 1'-7'.

50 Figura 4. Representación esquemática de la cepa B9320 del subgrupo B de RSV. Se crearon sitios BamHI en los cebadores oligonucleotídicos utilizados para la RT/PCR, con objeto de clonar los genes G y F de la cepa B9320 en el cDNA antigénico del subgrupo A2 de RSV (Figura 4A). Primero se subclonó en pUC19 un fragmento de cDNA que contenía los genes G y F de la cepa A2, del nucleótido 4326 al nucleótido 9387 (pUCRVH). Se crearon sitios Bgl II en las posiciones 4630 (juntura intergénica SH/G) (Figura 4B) y 7554 (juntura intergénica F/M2) (Figura 4C). Se insertó el cDNA de B93260 A-G y -F en pUCRVH, en el que se han suprimido los genes A-G y F. El clon de cDNA antigénico resultante fue denominado pRSVB-GF y fue utilizado para transfectar células HEp-2 para generar el virus RSVB-GF infeccioso.

60 Figura 5. Se caracterizó el virus RSVB-GF recombinante por RT/PCR usando cebadores específicos del subgrupo B de RSV. Los cebadores específicos del subgrupo B de RSV en la región G fueron incubados con partes alícuotas de los genomas víricos de RSV recombinantes y fueron sometidos a PCR. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Como se muestra, no se produjo producto de DNA alguno en la reacción de RT/PCR al usar RSV A2 como molde. Sin embargo, se vio un previsto producto de 254 pares de bases en la RT/PCR del RNA de RSVB-GF y en la PCR testigo del DNA plasmídico pRSV-GF como molde, lo que indica que el virus rescatado contenía los genes G y F procedentes del virus B9320.

Figura 6. Identificación de rRSVA2(B-G) quimérico por RT/PCR y análisis de la expresión de RNA por transferencia Northern. Figura 6A: análisis de rRSV A2(B-G) quimérico por RT/PCR, en comparación con A2(A2) de tipo

silvestre. El RNA viriónico extraído de rRSVA2 (B-G) (carriles 1 y 2) y rRSVA2 (carriles 3 y 4) fue inversamente transcrito utilizando un cebador hibridado a vRNA de sentido (-) en el gen F de RSV, en presencia (+) o ausencia (-) de transcriptasa inversa (RT), lo que fue seguido de una PCR con una pareja de cebadores que flanqueaba el sitio de inserción B-G. No se detectó DNA en la RT/PCR cuando la transcriptasa inversa (RT) estaba ausente (carriles 2 y 4). A partir de rRSVA(B-G) se produjo un fragmento de cDNA que era aproximadamente 1 kb mayor que el cDNA derivado de A2. Este producto de DNA de la PCR más largo fue sometido a digestión con la enzima de restricción Stu I, única para el gen B-G insertado (carril 5). Se indica el marcador de tamaños de DNA (M) de 100 pares de bases (bp; del inglés, *base pair*). Figura 6B: análisis de la expresión del mRNA de G por transferencia Northern. Se infectaron células HEP-2 con RSV B9320, rRSVA2 y rRSVA2(B-G) quimérico. 48 horas después de la infección, el RNA celular total fue extraído y fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído. El RNA fue transferido a una membrana de nailon Hybond, y el filtro fue hibridado con una sonda oligonucleotídica marcada con ³²P, específica para A2-G o específica para mRNA de B9320-G. En las células infectadas con rRSVA2 (B-G) se detectaron transcritos tanto específicos de A2 G como específicos de B9320 G. También se indica el transcrito de RNA de escape (G-M2) procedente de las células infectadas con rRSV A2 (B-G).

Figura 7. Análisis de la expresión proteica por rRSVA2 (B-G). Células HEP-2 fueron simuladamente infectadas (carriles 1 y 5) e infectadas con RSV B9320 (carriles 2 y 6), rRSVA2 (carriles 3 y 7) y rRSV A2 (B-G) (carriles 4 y 8). 14-18 horas después de la infección, se marcaron con ³⁵S-Promix las células infectadas y se inmunoprecipitaron los polipéptidos mediante un antisuero policlonal de cabra contra la cepa A2 de RSV (carriles 1-5) o mediante un antisuero policlonal de ratón contra la cepa B9320 de RSV (carriles 5-8). Los polipéptidos inmunoprecipitados fueron separados en un gel de poliacrilamida al 10%. En las células infectadas con rRSV A2 (B-G) se produjeron tanto la proteína G específica de RSV A2 como la proteína G específica de RSV B9320. La migración de la proteína G es indicada mediante un asterisco. Se indican las movilidades de la glicoproteína F1 y de las proteínas N, P y M. Los tamaños moleculares se muestran a la izquierda en kilodáltones.

Figura 8. Morfología de las placas de lisis de rRSV, rRSVC4G, rRSVA2(B-G) y el virus A2 de tipo silvestre (wt; del inglés, *wild-type*). Se infectaron células HEP-2 con cada virus y se incubaron a 35°C durante seis días. Las monocapas celulares fueron fijadas, visualizadas mediante inmunotinción y fotografiadas.

Figura 9. Curvas de crecimiento de rRSV, rRSVC4G, RSV A2 de tipo silvestre (wt A2) y rRSVA2(B-G) quimérico. Se infectaron células HEP-2 con cada virus, con una moi de 0,5, y se recolectó medio en intervalos de 24 horas. El título de cada virus fue determinado por duplicado mediante un ensayo de placas de lisis sobre células HEP-2 y fue visualizado mediante inmunotinción.

Figura 10. Haces de restos cargados de la proteína L de RSV, objetivos de la mutagénesis dirigida al sitio. Los restos contiguos de aminoácidos cargados de los haces fueron convertidos en alaninas por mutagénesis, dirigida al sitio, del gen L de RSV usando el sistema QuikChange (Stratagene) para mutagénesis dirigida al sitio.

Figura 11. Restos de cisteína de la proteína L de RSV, objetivos de la mutagénesis dirigida al sitio. Los restos de cisteína fueron convertidos en restos de alanina por mutagénesis, dirigida al sitio, del gen L de RSV usando el sistema QuikChange (Stratagene) para mutagénesis dirigida al sitio.

Figura 12. Identificación de mutantes de RSV por delección de M2-2 y SH. Las delecciones de M2-2 fueron generadas por digestión de pET(S/B) con Hind III, seguida de la reclonación de un fragmento Sac I a BamHI restante en un clon de longitud completa. Las delecciones de SH fueron generadas por digestión de pET(A/S) con Sac I, seguida de la reclonación de un fragmento Avr II-Sac I restante en un clon de longitud completa. Figura 12A: la identificación de los rRSVΔSH y rRSVΔM2-2 recuperados fue llevada a cabo por RT/PCR usando parejas de cebadores específicas para el gen SH y el gen M2-2, respectivamente. Figura 12B: también se detectó rRSVΔSHΔM2-2 por RT/PCR usando parejas de cebadores específicas para los genes M2-2 y SH. Los productos de la RT/PCR se desarrollaron en un gel de agarosa con bromuro de etidio, y las bandas se visualizaron mediante luz ultravioleta (UV).

Figura 13. Estructura del genoma de rA2ΔM2-2 y recuperación de rA2ΔM2-2. (A): las secuencias mostradas son la región del gen M2 que solapan los marcos de lectura abiertos M2-1 y M2-2. A través de los sitios Hind III introducidos (subrayados), se suprimió un total de 234 nt que codifican los 78 aminoácidos C-terminales de M2-2. Se mantienen los 12 restos de aminoácido N-terminales del marco de lectura abierto M2-2 ya que solapan con el gen M2-1. (B): productos de la RT/PCR del RNA vírico de rA2ΔM2-2 y rA2 usando los cebadores V1948 y V1581 en presencia (+) o ausencia (-) de transcriptasa inversa (RT). Se indica el tamaño del producto de DNA derivado de rA2 o rA2ΔM2-2.

Figura 14. Expresión de RNA vírico por rA2ΔM2-2 y rA2. (A): se extrajo el RNA total de células Vero infectadas con rA2 o rA2ΔM2-2 a las 48 horas después de la infección, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%/formaldehído 2,2 M y se transfirió a membranas de nailon. Cada transferencia fue hibridada con una ribosonda marcada con Dig y específica para el gen M2-2, M2-1, F, SH, G o N. El tamaño del marcador de RNA se indica a la izquierda. (B): se infectaron células HEP-2 y Vero con rA2 o rA2ΔM2-2 durante 24 horas y se extrajo el RNA celular total. La transferencia Northern de RNA fue hibridada con una ribosonda marcada con ³²P y específica para el gen F de sentido negativo, para detectar RNA genómico vírico, o con una ribosonda marcada con ³²P y específica para el gen F de sentido positivo, para detectar RNA antigenómico vírico y mRNA de F. El conjunto superior de la transferencia Northern de la derecha fue tomado de la porción superior del gel mostrado en el conjunto inferior y fue expuesto durante 1 semana para mostrar el antigenoma. El conjunto inferior de la transferencia Northern fue expuesto durante

3 horas para mostrar el mRNA de F. Se indican el genoma, el antigenoma, el mRNA de F y el RNA dicistrónico de F-M2.

Figura 15. Expresión de proteínas víricas en células infectadas con rA2ΔM2-2 y rA2. (A): células Vero simulada- mente infectadas, e infectadas con rA2 y rA2ΔM2-2 fueron metabólicamente marcadas con ³⁵S-Promix (3700 kBq/ml) de 14 a 18 horas después de la infección. Se prepararon lisados celulares para inmunoprecipitación con antisuero po- lyclonal de cabra anti-RSV o antisuero policlonal de conejo anti-M2-2. Los polipéptidos inmunoprecipitados fueron separados en un gel de poliacrilamida al 17,5% que contenía urea 4 M y fueron procesados para autoradiografía. Las posiciones de cada proteína vírica se indican a la derecha y los marcadores de tamaños de pesos moleculares se indican a la izquierda. (B): cinética de la síntesis proteica en células HEp-2 y Vero por transferencia Western. Se infectaron células HEp-2 y Vero con rA2 o rA2ΔM2-2 y, 10 horas, 24 horas o 48 horas después de la infección, los polipéptidos celulares infectados totales fueron separados en un gel de poliacrilamida al 17,5% que contenía urea 4 M. Las proteí- nas fueron transferidas a una membrana de nailon, y la transferencia fue sondada con antisueros policlonales contra M2-1, NS1 o SH, según se indica.

Figura 16. Morfología de las placas de lisis de rA2ΔM2-2 y rA2. Se infectaron células HEp-2 o Vero con rA2ΔM2-2 o rA2 bajo una capa semisólida compuesta de metilcelulosa al 1% y medio L15 1X que contenía suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum) al 2%, durante 5 días. Las placas víricas fueron visualizadas por inmunotinción con un antisuero policlonal de cabra anti-RSV y fueron fotografiadas bajo un microscopio.

Figura 17. Curvas de crecimiento de rA2ΔM2-2 en células HEp-2 y Vero. Se infectaron células Vero (A) o células HEp-2 (B) con rA2ΔM2-2 o rA2, con una moi de 0,5, y se recolectaron partes alícuotas del medio en intervalos de 24 horas, como se indica. Los títulos de los virus fueron determinados mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero. El título del virus en cada punto temporal es el valor medio de dos experimentos.

Figura 18. Análisis de rA2ΔNS1, rA2ΔNS2 y rA2ΔNS1ΔNS2 por transferencia Northern. Se extrajo el RNA celular total de células Vero infectadas con rA2, rA2ΔNS1, rA2ΔNS2 y rA2ΔNS1ΔNS2 a las 24 horas después de la infección, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%/formaldehído 2,2 M y se transfirió a membranas de nailon. Cada transferencia fue hibridada con una ribsonda marcada con Dig y específica para el gen NS1, NS2 o M2-2, como se indica.

Figura 19. Morfología de las placas de lisis de mutantes por delección. Se infectaron células HEp-2 o Vero con cada mutante por delección, como se indica, bajo una capa semisólida compuesta de metilcelulosa al 1% y medio L15 1X que contenía FBS al 2%, durante 6 días. Las placas víricas fueron visualizadas por inmunotinción con un antisuero policlonal de cabra anti-RSV y fueron fotografiadas bajo un microscopio.

Figura 20. Curvas de crecimiento de rA2ΔNS1 en células Vero. Se infectaron células Vero con rA2ΔNS1 o rA2, con una moi de 0,5, y se recolectaron partes alícuotas del medio en intervalos de 24 horas, como se indica. Los títulos de los virus se determinaron mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero.

Figura 21. Curvas de crecimiento de rA2ΔNS2 en células Vero. Se infectaron células Vero con rA2ΔNS2 o rA2, con una moi de 0,5, y se recolectaron partes alícuotas del medio en intervalos de 24 horas, como se indica. Los títulos de los virus se determinaron mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero.

Figura 22. Curvas de crecimiento de rA2ΔSHΔM2-2 en células Vero. Se infectaron células Vero con rA2ΔSHΔM2-2 o rA2, con una moi de 0,5, y se recolectaron partes alícuotas del medio en intervalos de 24 horas, como se indica. Los títulos de los virus se determinaron mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero.

Figura 23. Análisis de diversos mutantes por delección, mediante transferencia Northern. Se extrajo el RNA celular total de células Vero infectadas con cada mutante por delección, como se indica, a las 24 horas después de la infección, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%/formaldehído 2,2 M y se transfirió a membranas de nailon. Cada transferencia fue hibridada con una ribsonda marcada con Dig y específica para el gen NS1, NS2, SH o M2-2, como se indica.

Figura 24. Curvas de crecimiento de rA2ΔNS2ΔM2-2 en células Vero. Se infectaron células Vero con rA2ΔNS2ΔM2-2 o rA2, con una moi de 0,5, y se recolectaron partes alícuotas del medio en intervalos de 24 ho- ras, como se indica. Los títulos de los virus se determinaron mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero.

Figura 25. Curvas de crecimiento de rA2ΔNS1ΔNS2 en células Vero. Se infectaron células Vero con rA2ΔNS1ΔNS2 o rA2, con una moi de 0,5, y se recolectaron partes alícuotas del medio en intervalos de 24 horas, como se indica. Los títulos de los virus se determinaron mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero.

Figura 26. Inserción de los genes G y F de la cepa B9320 de RSV en la cepa A2 recombinante. Los genes G y F de B9320 fueron multiplicados por RT/PCR usando cebadores que contenían los sitios de la enzima de restricción BamH I. Luego se introdujo un casete de DNA que contenía los genes G y F de B9320 en el subclón pRSV(R/H) usando los introducidos sitios de la enzima de restricción Bgl II que flanqueaban los genes G y F de la cepa A2 de RSV. El fragmento de cDNA que contenía los genes G y F de B9320 fue posteriormente trasladado al cDNA antigenómico de A2 de longitud completa por ligación a los sitios Xho I y BamH I. Están subrayadas la señal de inicio génico del gen

G y la señal de fin génico del gen F de B9320 y están indicados los sitios de enzimas de restricción usados para la clonación.

Figura 27. Expresión, específica de la cepa, de las quimeras rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 de RSV. A: Expresión del RNA vírico. Se extrajo el RNA celular total de las células Vero infectadas con virus y se hibridaron las transferencias Northern con sondas específicas para el gen G o F del subgrupo A o el subgrupo B de RSV. La expresión del gen M2-2 fue examinada utilizando una ribsonda específica para el marco de lectura abierto M2-2. B: Expresión de proteínas víricas. Las células Vero infectadas fueron marcadas con ³⁵S-metionina y ³⁵S-cisteína, y el lisado celular fue inmunoprecipitado con anticuerpo policlonal anti-RSV o anticuerpo anti-M2-2. Para detectar la expresión de la proteína G, los extractos de las células infectadas fueron sometidos a transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal, específico de subgrupo, contra la proteína G. Tanto rA-G_BF_B como rA-G_BF_BΔM2-2 expresaban las proteínas G y F específicas del subgrupo B y conservaban la expresión normal de los otros genes derivados de la cadena principal del subgrupo A2. No se expresó proteína M2-2 en las células infectadas con rA-G_BF_BΔM2-2. Carril 1: rA2; carril 2: rA2ΔM2-2; carril 3: B9320; carril 4: rA-G_BF_B; carril 5: rA-G_BF_BΔM2-2.

Figura 28. Cinética de crecimiento de los virus quiméricos en células HEp-2 y Vero. Se infectaron por duplicado células HEp-2 o Vero con los virus, con una *moi* de 0,1 ó 0,01. En intervalos de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos infectados y se determinaron los títulos de los virus mediante un ensayo de placas de lisis en células Vero.

5. Descripción del invento

El presente invento se refiere a vectores víricos y virus RS recombinantes genéticamente contruidos que expresan genes G y F heterólogos y comprenden una delección del marco de lectura abierto M2-2. El invento se refiere a la construcción y uso de moldes de RNA de virus RS recombinantes de cadena negativa que pueden ser usados con RNA polimerasa viral dirigida por RNA para que se expresen productos génicos heterólogos en células huésped apropiadas y/o para rescatar el gen heterólogo en partículas víricas. Los moldes de RNA del presente invento pueden ser preparados mediante la transcripción de secuencias de DNA apropiadas usando una RNA polimerasa dirigida por DNA, tal como la polimerasa del bacteriófago T7, T3 o Sp6. Los moldes de RNA recombinante pueden ser usados para transfectar líneas celulares continuas/transfectadas que expresan las proteínas RNA polimerasa dirigida por RNA que permiten la complementación.

El invento es demostrado por medio de ejemplos de trabajo en que el RSV infeccioso es rescatado del cDNA que contiene el genoma de RSV, en sentido genómico o antígenómico, introducido en células que expresan las proteínas N, P y L del complejo de polimerasa del RSV. Los ejemplos básicos demuestran además que no se requiere la expresión el plásmido de expresión de M2-1 para la recuperación de RSV infeccioso a partir de cDNA, lo que es contrario a lo que se había comunicado previamente (Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-7). Además, la delección del M2-ORF2 del cDNA de RSV recombinante da lugar al rescate de partículas de RSV atenuadas. El RSV con M2-2 suprimido es un vehículo excelente para generar un RSV quimérico que codifique productos de genes heterólogos; estos vectores víricos quiméricos y estas partículas víricas rescatadas son útiles como vectores de expresión para la expresión de productos de genes heterólogos y como vacunas vivas atenuadas de RSV que expresan polipéptidos antígenicos de RSV o polipéptidos antígenicos de otros virus.

El invento es adicionalmente demostrado por medio de ejemplos de trabajo en que se utiliza un clon de cDNA que contiene el genoma completo de RSV, además de un promotor de T7, una ribozima del virus delta de la hepatitis y un terminador de T7, para generar una partícula vírica infecciosa cuando se cotransfecta con vectores de expresión que codifican las proteínas N, P y L de RSV. Además, en los ejemplos de trabajo se describen transcritos de RNA del DNA clonado que contienen la región de codificación, en orientación de sentido negativo, del gen de la cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT) o del gen de la proteína fluorescente verde (GFP; del inglés, green fluorescent protein) flanqueada por los nucleótidos 5'-terminales y 3'-terminales del genoma de RSV. Los ejemplos de trabajo demuestran además que un promotor de RSV mutado para que tuviera una actividad aumentada, dio lugar al rescate de partículas infecciosas de RSV a partir de un cDNA de RSV de longitud completa con elevada eficacia. Estos resultados demuestran el uso exitoso de moldes víricos recombinantes de cadena negativa y de polimerasa de RSV con actividad aumentada, para el rescate de RSV. Este sistema es una herramienta excelente para construir virus RSV con propiedades biológicas definidas, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas contra RSV, y para utilizar el RSV recombinante como un vector de expresión para la expresión de productos de genes heterólogos.

Este invento se refiere a la construcción y el uso de moldes de RNA vírico recombinante de cadena negativa que pueden ser utilizados con RNA polimerasa dirigida por RNA para que se expresen productos de genes G y F heterólogos de la cepa B9320 de RSV en células huésped apropiadas, para rescatar el gen heterólogo en partículas víricas y expresar moldes de RNA vírico recombinante quimérico y mutado de cadena negativa (véase la Patente de EE.UU. n° 5.166.057, concedida a Palese *et al.*, incorporada aquí por referencia en su totalidad). El producto del gen heterólogo es un péptido o proteína derivado de la cepa B9320 de RSV. Los moldes de RNA pueden estar en orientación de sentido positivo o negativo y son preparados mediante la transcripción de secuencias de DNA apropiadas utilizando una RNA polimerasa dirigida por DNA, tal como la polimerasa del bacteriófago T7, T3 o Sp6.

La capacidad para reconstituir RNPs *in vitro* permite el diseño de nuevos influenzavirus y virus RSV quiméricos que expresan genes extraños. Una manera de conseguir este objetivo implica modificar genes víricos existentes. Por

ejemplo, el gen G o F puede ser modificado para que contenga secuencias extrañas, tales como el gen HA de influenzavirus, en sus dominios externos. Cuando las secuencias heterólogas son epítomos o antígenos de patógenos, estos virus quiméricos pueden ser utilizados para provocar una respuesta inmune protectora contra el agente morbos del cual proceden estos determinantes. Por ejemplo, se puede construir un RNA quimérico en que una secuencia de codificación procedente de la región de codificación de gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana esté insertada en la secuencia de codificación de RSV, y se puede producir un virus quimérico a partir de la transfección de este segmento de RNA quimérico en una célula huésped infectada con RSV de tipo silvestre.

Además de modificar genes que codifican proteínas superficiales, se pueden alterar genes que codifican proteínas no superficiales. Se ha mostrado que estos últimos genes están asociados con la mayoría de las respuestas inmunes celulares importantes en el sistema del virus RS. De este modo, la inclusión de un determinante extraño en el gen G o F de RSV puede inducir, después de la infección, una respuesta inmune celular eficaz contra este determinante. Dicho planteamiento puede ser particularmente útil en situaciones en que la inmunidad protectora depende mucho de la inducción de respuestas inmunes celulares (por ejemplo, la malaria, etc.).

El presente invento también se refiere a la generación de un RSV recombinante atenuado, producido al introducir una delección específica del gen accesorio vírico M2-2. Además, el presente invento se refiere específicamente a la generación de un RSV recombinante atenuado que contiene una delección de combinación de los genes accesorios víricos M2-2/SH, los genes accesorios víricos M2-2/NS2 o los genes accesorios víricos NS1/NS2.

El invento es demostrado por medio de los ejemplos de trabajo aquí presentados en que el RSV atenuado infeccioso es rescatado de cDNA de RSV que contiene delecciones en el gen accesorio vírico M2-2, individualmente o en combinación con otros genes; los RSVs con delecciones tales como M2-2/SH y M2-2/NS2 representan vehículos excelentes para la generación de vacunas atenuadas vivas de RSV.

5.1. Construcción de los moldes de RNA recombinante

Utilizando técnicas conocidas en este campo técnico, se pueden construir secuencias de codificación de genes heterólogos flanqueadas por el complemento del promotor/sitio de unión de la polimerasa vírica, tal como, por ejemplo, el complemento del extremo 3' de RSV o los extremos 3' y 5' de RSV. Las secuencias de codificación de genes heterólogos pueden estar también flanqueadas por el complemento del promotor/sitio de unión de la polimerasa de RSV, tal como, por ejemplo, las secuencias líder y remolque de RSV, usando técnicas conocidas en este campo técnico. Las moléculas de DNA recombinante que contienen estas secuencias híbridas pueden ser clonadas y transcritas mediante una RNA polimerasa dirigida por DNA, tal como la polimerasa del bacteriófago T7, T3 o Sp6 y similares, para producir los moldes de RNA recombinante que poseen las apropiadas secuencias víricas que permiten el reconocimiento y la actividad de la polimerasa vírica.

En una realización preferida del presente invento, las secuencias heterólogas proceden del genoma de otra cepa de RSV; por ejemplo, se construye el genoma de la cepa A de RSV para que incluya las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos antigénicos G y F de la cepa B9320 de RSV o fragmentos de las mismas. En dicha realización del invento, se pueden utilizar secuencias de codificación heterólogas de otra cepa de RSV para sustituir las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos antigénicos de la cepa de partida, o para que se expresen además de los polipéptidos antigénicos de la cepa originaria, por lo que se construye un genoma de RSV recombinante que expresa los polipéptidos antigénicos de una, dos o más cepas de RSV.

Un procedimiento para construir estas moléculas híbridas es insertar la secuencia de codificación heteróloga en un DNA complementario de un RNA genómico de RSV para que la secuencia heteróloga esté flanqueada por las secuencias víricas necesarias para la actividad de la polimerasa vírica; es decir, el promotor/sitio de unión de la polimerasa vírica, al que en lo sucesivo se hace referencia como sitio de unión de la polimerasa vírica. En un procedimiento alternativo, los oligonucleótidos que codifican el sitio de unión de la polimerasa vírica, por ejemplo, el complemento del extremo 3' o ambos extremos de los segmentos genómicos víricos, pueden ser ligados a la secuencia de codificación heteróloga para construir la molécula híbrida. La colocación de un gen extraño o un segmento de un gen extraño en una secuencia diana venía antiguamente dictada por la presencia de sitios de restricción apropiados en la secuencia diana. Sin embargo, recientes avances en biología molecular han reducido en gran medida este problema. Se pueden poner fácilmente sitios de enzimas de restricción en cualquier parte de una secuencia diana mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488). Variaciones en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita *infra*, también permiten la inserción específica de secuencias (es decir, sitios de enzimas de restricción) y permiten la construcción sencilla de moléculas híbridas. Alternativamente, se podrían utilizar reacciones PCR para preparar moldes recombinantes sin necesidad de clonación. Por ejemplo, se podrían usar reacciones PCR para preparar moléculas de DNA de doble cadena que contuvieran un promotor de RNA polimerasa dirigida por DNA (por ejemplo, el bacteriófago T3, T7 o Sp6) y la secuencia híbrida que contiene el gen heterólogo y el sitio de unión de la polimerasa de influenzavirus. Los moldes de RNA podrían ser luego directamente transcritos a partir de este DNA recombinante. En aún otra realización, los moldes de RNA recombinante pueden ser preparados al ligar, usando una RNA ligasa, RNAs que especifican la polaridad negativa del gen heterólogo y el sitio de unión de la polimerasa vírica. En las subsecciones siguientes se describen los requisitos de secuencia para la actividad polimerasa vírica y las construcciones que se pueden utilizar de acuerdo con el invento.

5.1.1. Inserción de los genes heterólogos

El gen que codifica la proteína L contiene un único marco de lectura abierto. Los genes que codifican m2 contienen dos marcos de lectura abiertos para ORF1 y 2, respectivamente. NS1 y NS2 son codificados por dos genes, NS1 y NS2. Las proteínas G y F, codificadas por genes distintos, son las principales glicoproteínas superficiales del virus. En consecuencia, estas proteínas son las principales dianas para la respuesta inmune humoral después de la infección. La inserción de una secuencia génica extraña en cualquiera de estas regiones de codificación podría ser llevada a cabo mediante la adición de las secuencias extrañas que se van a expresar o mediante la sustitución completa de la región de codificación vírica por el gen extraño, o mediante una sustitución parcial. La secuencias heterólogas insertadas en el genoma de RSV pueden tener cualquier longitud hasta aproximadamente 5 kilobases. La sustitución completa sería probablemente llevada mejor a cabo mediante el uso de una mutagénesis dirigida por PCR.

Alternativamente, se podría construir un mRNA bicistrónico que permitiera la iniciación interna de la traducción de las secuencias víricas y permitiera la expresión de secuencias de codificación de proteínas extrañas a partir del sitio de iniciación terminal normal. Alternativamente, se puede construir una secuencia de mRNA bicistrónico en que la secuencia vírica sea traducida a partir del marco de lectura abierto terminal normal mientras que la secuencia extraña sea iniciada a partir de un sitio interno. Se pueden utilizar ciertas secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES; del inglés, internal ribosome entry site). La secuencias del IRES que se elijan deberían ser lo suficientemente cortas para no interferir en las limitaciones de empaquetamiento del virus RS. Por lo tanto, es preferible que el IRES elegido para dicho procedimiento bicistrónico tenga una longitud no superior a 500 nucleótidos, prefiriéndose una longitud inferior a 250 nucleótidos. Además, es preferible que el IRES utilizado no comparta homología de secuencia ni homología estructural con elementos picornavirales. Los elementos de IRES preferidos incluyen, pero no se limitan a, el IRES de BiP de mamífero y el IRES del virus C de la hepatitis.

5.2. Expresión de productos de genes heterólogos utilizando un molde de RNA recombinante

Los moldes recombinantes preparados del modo antes descrito pueden ser usados de diversas maneras para que se expresen los productos de genes heterólogos en células huéspedes apropiadas o se creen virus quiméricos que expresen los productos de genes heterólogos. En una realización, el molde recombinante puede ser combinado con el complejo de polimerasa viral purificado *infra*, para producir rRNPs que sean infecciosas. Con este fin, el molde recombinante se puede transcribir en presencia del complejo de polimerasa viral. Alternativamente, el molde recombinante se puede mezclar con, o transcribir en presencia de, el complejo de polimerasa viral preparado al usar métodos de DNA recombinante (véase, por ejemplo, Kingsbury *et al.*, 1987, Virology 156: 396-403). En aún otra realización, el molde recombinante puede ser usado para transfectar células huésped apropiadas, para dirigir la expresión del producto del gen heterólogo a altos niveles. Los sistemas de células huésped que proporcionan elevados niveles de expresión incluyen líneas celulares continuas que suministran funciones víricas, tales como líneas celulares superinfectadas con RSV, líneas celulares construidas para complementar funciones víricas del RSV, etc.

5.3. Preparación de un virus RNA quimérico de cadena negativa

Con objeto de preparar un virus quimérico, se pueden utilizar RNPs reconstituidas que contienen RNAs modificados de RSV o RNAs que codifican proteínas extrañas, para transfectar células que están también infectadas con un virus RSV "paterno". Alternativamente, las preparaciones de RNPs reconstituidas pueden ser mezcladas con las RNPs del virus paterno de tipo silvestre y ser directamente utilizadas para la transfección. Después de la transfección, se pueden aislar los nuevos virus y se pueden identificar sus genomas mediante un análisis por hibridación. En procedimientos adicionales aquí descritos para la producción de virus quiméricos infecciosos, se pueden replicar rRNPs en sistemas de células huésped que expresan las proteínas polimerasas víricas de RSV o influenzavirus (por ejemplo, en sistemas de expresión de virus/célula huésped, líneas celulares transformadas y diseñadas para que expresen las proteínas polimerasas, etc.), para que se rescaten virus quiméricos infecciosos; en este caso, no es necesario utilizar un virus auxiliar ya que esta función es proporcionada por las proteínas polimerasas víricas expresadas. En un procedimiento particularmente deseable, células infectadas con rRNPs construidas para los ocho segmentos de influenzavirus pueden dar lugar a la producción de virus quiméricos infecciosos que contienen el genotipo deseado, eliminándose de este modo la necesidad de un sistema de selección.

En teoría se puede sustituir cualquiera de los genes de RSV, o parte de cualquiera de los genes de RSV, por la secuencia extraña. Sin embargo, una parte necesaria de esta ecuación es la capacidad para que se propague el virus defectuoso (defectuoso porque falta o está alterado un producto de un gen vírico normal). Para evitar este problema existen diversos procedimientos posibles.

Un tercer procedimiento para que se propague el virus recombinante puede implicar el cultivo conjunto con el virus de tipo silvestre. Esto podría realizarse tomando simplemente el virus recombinante y coinfectando las células con éste y con otro virus de tipo silvestre (preferiblemente una cepa de vacuna). El virus de tipo silvestre debería complementar el producto del gen vírico defectuoso y permitir el crecimiento tanto del virus de tipo silvestre como del virus recombinante. Ésta sería una situación análoga a la propagación de partículas interferentes defectuosas de influenzavirus (Nayak *et al.*, 1983, en "Genetics of Influenza Viruses", compilado por P. Palese y D. W. Kingsbury, Springer-Verlag, Viena, páginas 255-279). En el caso de virus interferentes defectuosos, se pueden modificar las condiciones para que la mayor parte del virus propagado sea la partícula defectuosa en lugar del virus de tipo silvestre.

Por lo tanto, este procedimiento puede ser útil para generar reservas del virus recombinante con altos títulos. Sin embargo, estas reservas contendrían necesariamente algo de virus de tipo silvestre.

Alternativamente, se pueden replicar RNPs sintéticas en células coinfectadas con virus recombinantes que expresan las proteínas polimerasas de virus RS. En realidad, este método puede ser usado para rescatar el virus recombinante infeccioso de acuerdo con el invento. Con este fin, las proteínas polimerasas del virus RSV se pueden expresar en cualquier sistema de vector de expresión/célula huésped, incluyendo, pero sin limitarse a, vectores de expresión víricos (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, baculovirus, etc.) o líneas celulares que expresan las proteínas polimerasas (véase, por ejemplo, Krystal *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2709-2713).

5.4. Generación de virus quiméricos con un fenotipo atenuado por delección de M2-2

Los métodos del presente invento pueden ser utilizados para introducir mutaciones o secuencias heterólogas para generar virus quiméricos atenuados que tienen muchas aplicaciones, incluyendo el análisis de la biología molecular, la patogénesis y las propiedades de crecimiento e infección del RSV. De acuerdo con el presente invento, se pueden introducir secuencias heterólogas de G y F en, por ejemplo, las secuencias de codificación de la proteína F o G, o las secuencias de codificación de NS1, NS2, M1ORF1, M2ORF2, N, P o L. De acuerdo con el presente invento, se elimina el gen M2-2 para generar un fenotipo atenuado.

De acuerdo con el presente invento, un RSV atenuado presenta un grado sustancialmente menor de virulencia en comparación con un virus de tipo silvestre, incluyendo una menor velocidad de crecimiento, por lo que los síntomas de la infección vírica no tienen lugar en un individuo inmunizado.

5.5. Formulaciones de vacunas usando los virus quiméricos

En una realización preferida, el presente invento se refiere a vacunas de RSV bivalentes que confieren protección frente a RSV-A y RSV-B. Para formular dicha vacuna, se utiliza un virus RS quimérico que expresa los polipéptidos antigénicos de ambos subtipos, A y B, de RSV.

Se puede formular una vacuna vírica recombinante viva o una vacuna vírica recombinante inactivada. Se puede preferir una vacuna viva porque la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de clase y magnitud similares a las que tienen lugar en las infecciones naturales, y, por lo tanto, confiere una inmunidad sustancial de larga duración. La producción de dichas formulaciones de vacunas de virus recombinante vivo puede ser llevada a cabo utilizando métodos convencionales que implican la propagación del virus en un cultivo celular o en el alantoides de un embrión de gallina, seguida de purificación.

A este respecto, el uso de RSVs genéticamente contruidos (vectores) con fines de vacuna puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. Los actuales candidatos a vacunas de influenzavirus vivos para uso en seres humanos son adaptados al frío, sensibilizados a la temperatura o sometidos a pases para que deriven varios (seis) genes de influenzavirus aviáres, lo que da lugar a una atenuación. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, delecciones) en los moldes utilizados para la transfección puede proporcionar los nuevos virus con características de atenuación. Por ejemplo, en las mutaciones por delección se pueden crear mutaciones específicas de sentido erróneo que estén asociadas con la sensibilidad a la temperatura o la adaptación al frío. Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con los mutantes sensibles al frío o a la temperatura, y las frecuencias de reversión deberían ser muy bajas.

Alternativamente, se pueden construir virus quiméricos con características “suicidas”. Dichos virus sólo pasarían por un ciclo o unos pocos ciclos de replicación en el huésped. Cuando se usa como una vacuna, el virus recombinante pasaría por un solo ciclo de replicación y provocaría un nivel suficiente de respuesta inmune, pero no seguiría más en el huésped humano ni causaría enfermedad. Los virus recombinantes que carecen de uno o más de los genes esenciales del virus RS no podrían experimentar ciclos sucesivos de replicación. Dichos virus defectuosos pueden ser producidos al utilizar RNPs reconstituidas que carecen de un(os) gen(es) específico(s) para cotransfectar líneas celulares que expresan permanentemente este(os) gen(es). Los virus que carecen de un(os) gen(es) esencial(es) se replicarán en estas líneas celulares pero, cuando se administren al huésped humano, no podrán completar un ciclo de replicación. Dichas preparaciones pueden transcribir y traducir, en este ciclo abortivo, un número suficiente de genes para provocar una respuesta inmune. Alternativamente, se podrían administrar mayores cantidades de las cepas, por lo que estas preparaciones servirían como vacunas víricas inactivadas (muertas). Para las vacunas inactivadas, se prefiere que el producto del gen heterólogo se exprese como un componente viral para que el producto génico esté asociado con el virión. La ventaja de dichas preparaciones es que contienen proteínas nativas y no experimentan inactivación por tratamiento con formol u otros agentes utilizados en la fabricación de vacunas víricas muertas.

En otra realización de este aspecto del invento, las formulaciones de vacunas inactivadas pueden ser preparadas utilizando técnicas convencionales para “matar” los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están “muertas” en el sentido de que su infectividad ha quedado destruida. Idealmente, la infectividad del virus es destruida sin que su inmunogenicidad resulte afectada. Con objeto de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede ser desarrollado en un cultivo celular o en el alantoides de un embrión de gallina, purificado por ultracentrifugación zonal, inactivado mediante formaldehído o β -propiolactona, y reunido. Normalmente, la vacuna resultante es inoculada intramuscularmente.

Los virus inactivados pueden ser formulados con un agente adyuvante adecuado con objeto de potenciar la respuesta inmunológica. Dichos agentes adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a, geles minerales, tales como, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos y polianiones; péptidos; emulsiones oleosas; y agentes adyuvantes potencialmente útiles para seres humanos, tales como BCG y *Corynebacterium parvum*.

Se pueden utilizar muchos métodos para introducir las formulaciones de vacuna anteriormente descritas; aquellos incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intranasal. Puede que sea preferible introducir la formulación de vacuna vírica quimérica a través de la vía natural de infección del patógeno para el cual se diseña la vacuna. Cuando se utiliza una preparación de vacuna vírica quimérica viva, puede que sea preferible introducir la formulación a través de la vía natural de infección del virus de la gripe. Se puede utilizar ventajosamente la capacidad del RSV y el virus de la gripe para provocar una vigorosa respuesta inmune secretora y celular. Por ejemplo, la infección del tracto respiratorio por virus de la gripe o RSV quiméricos puede provocar una potente respuesta inmune secretora, por ejemplo, en el sistema urogenital, con protección concomitante frente a un particular agente causativo de enfermedad.

En las secciones siguientes se describe a modo de ejemplo, y no de limitación, la manipulación de los genomas de virus RNA de cadena negativa, usando RSV como un ejemplo para demostrar la aplicabilidad de los métodos del presente invento para generar virus quiméricos con el fin de expresión de genes heterólogos, generándose partículas víricas infecciosas y partículas víricas atenuadas con fines de vacunación.

6. Rescate de virus respiratorios sincitiales (RSV) infecciosos usando RNA derivado de DNAs recombinantes específicos

En este ejemplo se describe un procedimiento para el rescate de un virus respiratorio sincitial (RSV) infeccioso, derivado de cDNAs recombinantes que codifican el genoma de RNA entero de RSV, en RSVs estables e infecciosos, como se indicó en la anterior Sección 5. Este procedimiento puede ser utilizado en la producción de virus RSV quiméricos que puedan expresar genes G y F heterólogos. Otro modo ejemplar de alcanzar la producción de RSV quiméricos implica la modificación de genes nativos existentes de RSV, como se describe adicionalmente. En consecuencia, en este ejemplo también se describe la utilidad de este procedimiento en la atenuación dirigida de la patogenicidad de RSV, para dar lugar a la producción de una vacuna con unas propiedades biológicas diseñadas y definidas para uso en seres humanos.

La primera fase del procedimiento de rescate que afecta al genoma de RNA entero de RSV requiere la síntesis de una copia de longitud completa del genoma de 15 kilobases (kb) de la cepa A2 de RSV. Esto es llevado a cabo por corte y empalme conjunto de cDNAs subgenómicos de doble cadena (utilizando procedimientos estándares para manipulación genética) cuyo tamaño varía de 1 kb a 3,5 kb, para formar el cDNA genómico completo. La determinación de la secuencia de nucleótidos del cDNA genómico permite la identificación de los errores introducidos durante el proceso de ensambladura, errores que pueden ser corregidos por mutagénesis dirigida al sitio o por sustitución de la región errónea por un trozo de DNA de doble cadena químicamente sintetizado. Después de la ensambladura, el cDNA genómico es dispuesto adyacentemente a un promotor transcripcional (por ejemplo, el promotor de T7) en un extremo y a una secuencia de DNA que permite la terminación transcripcional en el otro extremo, por ejemplo, una endonucleasa específica o una ribozima, para permitir la síntesis de una copia de RNA de sentido positivo o negativo del genoma viral completo *in vitro* o en células cultivadas. Las secuencias líder o remolque pueden contener secuencias adicionales según se desee, tales como una ribozima flanqueadora y terminadores transcripcionales de T7 en tándem. La ribozima puede ser una ribozima del virus delta de la hepatitis o una ribozima de martillo, y actúa para producir un extremo 3' exacto, exento de nucleótidos no víricos.

De acuerdo con este aspecto del invento, en la secuencia genómica del RSV nativo se pueden realizar mutaciones, sustituciones o deleciones que den lugar a un aumento de la actividad del promotor de RSV. Los solicitantes han demostrado que incluso un aumento de la actividad del promotor de RSV potencia mucho la eficacia del rescate de RSV, lo que permite el rescate de partículas infecciosas de RSV a partir de un cDNA de RSV de longitud completa que lleva la mutación. En particular, una mutación puntual en la posición 4 del genoma (C a G) da lugar a un aumento de varias veces en la actividad promotora y al rescate de partículas virales infecciosas a partir de un clon de cDNA de RSV de longitud completa que lleva la mutación.

En el procedimiento de rescate se utiliza la interacción del RNA de longitud completa del genoma de la cepa A2 de RSV, que es transcrito a partir del cDNA construido, con proteínas de un virus auxiliar del subgrupo B de RSV dentro de células cultivadas. Esto puede ser llevado a cabo de diversas formas. Por ejemplo, se puede transcribir *in vitro* el RNA genómico viral de longitud completa de la cepa A2 de RSV y se pueden transfectar con él células, tales como células 293, infectadas con la cepa B9320 de RSV usando protocolos de transfección estándares. Además, el RNA genómico transcrito *in vitro* de la cepa A2 de RSV puede ser usado para transfectar una línea celular que expresa las proteínas esenciales de la cepa A2 de RSV (en ausencia de un virus auxiliar) a partir de genes víricos establemente integrados.

Alternativamente, el RNA genómico viral transcrito *in vitro* (cepa A2 de RSV) puede ser también usado para transfectar células infectadas con un virus heterólogo (por ejemplo, un virus vaccinia en particular) que expresa las proteínas auxiliares esenciales de la cepa A2 de RSV, específicamente las proteínas N, P, L y/o M2-ORF1. Además,

el RNA genómico transcrito *in vitro* puede ser usado para transfectar células infectadas con un virus heterólogo, por ejemplo, un virus vaccinia, que expresa polimerasa de T7, lo que permite la expresión de proteínas auxiliares a partir de DNAs plasmídicos transfectados que contienen los genes auxiliares N, P y L.

5 Como una alternativa a la transfección con RNA genómico transcrito *in vitro*, el DNA plasmídico que contiene la construcción entera de cDNA de RSV puede ser utilizado para transfectar células infectadas con un virus heterólogo, por ejemplo, un virus vaccinia, que expresa las proteínas auxiliares esenciales de la cepa A2 de RSV y polimerasa de T7, permitiéndose de este modo la transcripción del RNA genómico entero de RSV a partir del DNA plasmídico que contiene la construcción de cDNA de RSV. Sin embargo, no es necesario que el virus vaccinia proporcione las
10 propias proteínas auxiliares, sino sólo la polimerasa de T7; las proteínas auxiliares pueden expresarse luego a partir de plásmidos de transfección que contienen los genes N, P y L de RSV, apropiadamente dispuestos adyacentemente a sus propios promotores de T7.

15 Cuando el virus replicante está proporcionando la función auxiliar durante los experimentos de rescate, se utiliza la cepa B9320 de RSV, lo que permite la diferenciación del rescate de progenie dirigido contra B9320 de RSV. La cepa A2 de RSV rescatada es positivamente identificada por la presencia de específicas secuencias nucleotídicas “marcadoras” insertadas en la copia de cDNA del genoma de RSV antes del rescate.

20 El establecimiento de un sistema de rescate para la cepa A2 nativa, es decir, “de tipo silvestre”, de RSV permite que se introduzcan modificaciones en la copia de cDNA del genoma de RSV para construir un RSV quimérico que contenga secuencias en cierto modo heterólogas con respecto a las del RSV nativo, por lo que el virus rescatado resultante puede tener una patogenicidad atenuada para proporcionar una vacuna humana segura y eficaz, como se discutió antes en la Sección 5.4.

25 Además de la(s) alteración(es) (incluyendo la alteración que resulta de la translocación) del material genético de RSV para proporcionar una secuencia heteróloga, este procedimiento permite la inserción de genes “extraños” (es decir, genes no nativos con respecto al RSV) o componentes genéticos de los mismos que presentan una antigenicidad o función biológica tal que proporciona la expresión de estos elementos genéticos; de esta manera, el RSV quimérico modificado puede actuar como un sistema de expresión para otras proteínas o elementos genéticos heterólogos, tales
30 como ribozimas, RNA antisentido, oligorribonucleótidos específicos, con potencial profiláctico o terapéutico, u otras proteínas víricas con fines de vacunas.

6.1. *Rescate de las secuencias líder y remolque de la cepa A2 de RSV usando la cepa B9320 de RSV como virus auxiliar*

35 6.1.1. *Virus y células*

Aunque en este Ejemplo se usó la cepa A2 de RSV, es ejemplar. La utilización de otras cepas del subgrupo A de RSV de acuerdo con las enseñanzas de este Ejemplo está dentro de la experiencia en la técnica. Los métodos en que
40 se emplean dichas cepas distintas quedan abarcados por el invento.

Se cultivaron la cepa A2 de RSV y la cepa B9320 de RSV en células HEp-2 y células Vero, respectivamente, y se utilizaron células 293 como huésped durante los experimentos de transfección/rescate. Las tres líneas celulares se obtuvieron de la Colección America de Cultivos Tipo (ATCC; del inglés, American Type Culture Collection; Rockville, Maryland, EE.UU.).
45

6.1.2. *Construcción y análisis funcional de plásmidos informadores*

50 Se construyó el plásmido pRSVA2CAT (Figura 1) del modo descrito a continuación.

Los cDNAs de los componentes líder, de 44 nucleótidos, y remolque, de 155 nucleótidos, de la cepa A2 de RSV [véanse Mink *et al.*, Virology 185: 615-624 (1991); y Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 9663-9667 (1991)], componente remolque que también incluía la secuencia de consenso del promotor de la polimerasa del bacteriófago T7, fueron ensamblados separadamente por hibridación controlada de oligonucleótidos con complementariedad solapante
55 parcial (véase la Figura 1). Los oligonucleótidos utilizados en la hibridación fueron sintetizados en un sintetizador de DNA de Applied Biosystems (Foster City, California, EE.UU.). En la Figura 1 se indican los oligonucleótidos separados y sus posiciones relativas en las secuencias líder y remolque. Los oligonucleótidos utilizados para construir la secuencia líder fueron:

60

65

ES 2 291 370 T3

1. 5'CGA CGC ATA TTA CGC GAA AAA ATG CGT ACA ACA AAC TTG CAT
AAA C

2. 5'CAA AAA AAT GGG GCA AAT AAG AAT TTG ATA AGT ACC ACT TAA
ATT TAA CT

3. 5'CTA GAG TTA AAT TTA AGT GGT ACT

4. 5'TAT CAA ATT CTT ATT TGC CCC ATT TTT TTG GTT TAT GCA AGT
TTG TTG TA

5. 5'CGC ATT TTT TCG CGT AAT ATG CGT CGG TAC

Los oligonucleótidos usados para construir la secuencia remolque fueron:

1. 5'GTA TTC AAT TAT AGT TAT TAA AAA TTA AAA ATC ATA TAA TTT TTT
AAA TA

2. 5'ACT TTT AGT GAA CTA ATC CTA AAG TTA TCA TTT TAA TCT TGG
AGG AAT AA

3. 5'ATT TAA ACC CTA ATC TAA TTG GTT TAT ATG TGT ATT AAC TAA
ATT ACG AG

4. 5'ATA TTA GTT TTT GAC ACT TTT TTT CTC GTT ATA GTG AGT CGT
ATT A

5. 5'AGC TTA ATA CGA CTC ACT ATA ACG A

6. 5'GAA AAA AAG TGT CAA AAA CTA ATA TCT CGT AAT TTA GTT AAT
ACA CAT AT

7. 5'AAA CCA ATT AGA TTA GGG TTT AAA TTT ATT CCT CCA AGA TTA
AAA TGA TA

8. 5'ACT TTA GGA TTA GTT CAC TAA AAG TTA TTT AAA AAA TTA TAT
GAT TTT TA

9. 5'ATT TTT AAT AAC TAT AAT TGA ATA CTG CA

Los cDNAs líder y remolque completos fueron luego ligados, respectivamente, a los sitios XbaI y PstI del gen informador de cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) para formar una construcción lineal de cDNA de RSV/CAT de 1 kb. Esta construcción de cDNA fue luego ligada a los sitios Kpn I y Hind II de pUC19. La integridad de la construcción pRSVA2CAT final fue comprobada mediante el análisis, en gel, del tamaño de los productos de digestión con Xba I/Pst I y Kpn I/Hind II. Los cDNAs líder y remolque completos fueron también ligados al gen de la proteína fluorescente verde (GFP) usando los apropiados sitios de enzimas de restricción para formar una construcción de cDNA lineal. La construcción RSV-GFP-CAT resultante es una construcción informadora bicistónica que expresa tanto CAT como GFP.

La transcripción *in vitro* de pRSVA2CAT, linealizado con Hga I, con la polimerasa del bacteriófago T7 fue llevada a cabo de acuerdo con el protocolo del proveedor de T7 (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Se infectaron células 293 confluentes en placas de seis pocillos ($\sim 1 \times 10^6$ células por pocillo) con la cepa B9320 de RSV, con una multiplicidad de 1 unidad formadora de placa (pfu) por célula, y, 1 hora más tarde, se transfectaron con 5-10 μ g del RNA transcrito *in vitro* de la construcción pRSVA2CAT. El procedimiento de transfección siguió el procedimiento de transfección de Collins *et al.*, Virology 195: 252-256 (1993), y se emplearon los reactivos Transect/ACTTM

y Opti-MEM de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Gibco-BRL, Bethesda, Maryland, EE.UU.). 24 horas después de la infección, las células 293 fueron analizadas en cuanto a la actividad CAT usando un protocolo estándar ("Current Protocols in Molecular Biology", Volumen 1, Capítulo 9.6.2; Gorman *et al.*, 1982, Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051). La detección de niveles elevados de actividad CAT indicó que el RNA de sentido negativo, transcrito *in vitro*, que contenía las regiones "líder" y "remolque" del genoma de la cepa A2 de RSV y el gen CAT se podía encapsidar, replicar y expresar usando proteínas suministradas por la cepa B9320 de RSV (véase la Figura 2). El nivel de actividad CAT observado en estos experimentos era al menos tan elevado como el observado en similares experimentos de rescate en que se utilizaba la cepa A2 homóloga de RSV como virus auxiliar. Según el conocimiento de los solicitantes al día de hoy, no se ha comunicado formalmente la capacidad de una cepa B9320 de RSV del subgrupo B antígenicamente distinta para soportar la encapsidación, replicación y transcripción de un RNA de la cepa A2 de RSV del subgrupo A.

6.2. Construcción de un cDNA que representa el genoma completo de RSV

Para obtener un molde para la síntesis de cDNA, el RNA genómico de RSV, que comprende 15.222 nucleótidos, fue purificado a partir de células HEp-2 infectadas, de acuerdo con el método descrito por Ward *et al.*, J. Gen. Virol. 64: 1867-1876 (1983). Basándose en la secuencia de nucleótidos publicada de RSV, se sintetizaron oligonucleótidos, utilizando un sintetizador de DNA de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), para que actuaran como cebadores para la síntesis de las cadenas primera y segunda de cDNA a partir del molde de RNA genómico. En la Figura 3 se indican las secuencias de nucleótidos y las posiciones relativas de los cebadores de cDNA y los sitios de endonucleasas clave en el genoma de RSV. La producción de cDNAs a partir de RNA genómico de virus fue llevada a cabo de acuerdo con el protocolo de transcripción inversa/reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR) de Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut, EE.UU. (véase también Wang *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 9717-9721). Los cDNAs multiplicados fueron purificados por electroelución de la apropiada banda de DNA de los geles de agarosa. El DNA purificado fue ligado directamente al vector plasmídico pCRII (Invitrogen Corp., San Diego, EE.UU.) y fue usado para transformar células "One Shot" de *E. coli* (Invitrogen) o células "SURE" de *E. coli* (Stratagene, San Diego, EE.UU.). Los cDNAs clonados resultantes, específicos de virus, fueron ensamblados mediante técnicas de clonación estándares [Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.), 1989] para producir un cDNA que abarcaba el genoma completo de RSV. Se secuenció el genoma entero de cDNA y se sustituyeron las secuencias incorrectas mediante mutagénesis dirigida al sitio o mediante cDNA químicamente sintetizado. Se introdujeron sustituciones nucleotídicas en las bases 7291 y 7294 (estando el número de base 1 en el inicio del extremo 3' del RNA genómico) del gen F, para producir un nuevo sitio de endonucleasa Stu I, y en las posiciones 7423, 7424 y 7425 (también del gen F) para producir un nuevo sitio Pme I. Estos cambios fueron diseñados para que actuaran como marcadores definitivos para los procesos de rescate. La polimerasa del bacteriófago T7 y el sitio de la endonucleasa Hga I fueron dispuestos en extremos opuestos del cDNA del genoma viral para que se pudiera sintetizar *in vitro* RNA genómico viral de sentido positivo o sentido negativo. Los cDNAs que representaban la secuencia promotora de polimerasa de T7 y la secuencia de reconocimiento para Hga I fueron sintetizados en un sintetizador de DNA de Applied Biosystems y fueron ligados separadamente a los extremos del cDNA del genoma vírico o fueron añadidos como parte integral de los cebadores de PCR durante la multiplicación de la porción terminal del cDNA genómico, según fuera apropiado; este último procedimiento fue utilizado cuando no había sitios de endonucleasa adecuados cerca de los extremos del cDNA genómico, lo que evitaba la ligación directa del cDNA químicamente sintetizado de promotor de T7/sitio Hga I al cDNA genómico. Esta construcción completa (cDNA genómico y promotor de T7/secuencia de reconocimiento de Hga I flanqueadores) fue luego clonada en los sitios Kpn I/Not I del fagómido Bluescript II SK (Stratagene, San Diego, EE.UU.) del que se había eliminado el promotor endógeno de T7 mediante mutagénesis dirigida al sitio. El RNA transcrito a partir de esta construcción genómica completa puede ser rescatado utilizando un virus auxiliar del subgrupo B de RSV para obtener un RSV infeccioso de acuerdo con el Ejemplo 6.1. Este sistema de rescate básico para el RNA genómico de la cepa A2 nativa, es decir, "de tipo silvestre", de RSV puede ser empleado para introducir una diversidad de modificaciones en la copia de cDNA del genoma, para dar lugar a la introducción de secuencias heterólogas en el genoma. Dichos cambios pueden ser diseñados para reducir la patogenicidad vírica sin restringir la replicación del virus hasta un punto en que el rescate sea imposible o en que la expresión de los genes víricos sea insuficiente para estimular una inmunidad adecuada.

ES 2 291 370 T3

Se utilizaron los oligonucleótidos siguientes para construir la secuencia de ribozima/terminator de T7:

```
5'GGT*GGCCGGCATGGTCCCAGC
3'CCACCGGCCGTACCAGGGTCG
CTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACA
GAGCGACCGCGGCCGACCCGTGTG
TTCCGAGGGGACCGTCCCCTCGGT
AAGGCTCCCCTGGCAGGGGAGCCA
AATGGCGAATGGGACGTGCACAGC
TTACCGCTTACCCTGCAGCTGTGCG
TAACAAAGCCCGAAGGAAGCT
ATTGTTTCGGGCTTCCTTCGA

GAGTTGCTGCTGCCACCGTTG
CTCAACGACGACGGAGGCAAC
AGCAATAACTAGATAACCTTGGG
TCGTTATTGATCTATTGGAACCC
CCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTCT
GGAGATTTGCCCAGAACTCCCAGA
TTTTGCTGAAAGGAGGAACTA
AAAACGACTTTCCTCCTTGAT
TATGCGGGCCGCGTCGACGGTA
ATACGCCGGCGEAGCTGCCAT
CCGGGCCCCGCCTTCGAAG3'
GGCCCGGGCGGAAGCTTC5'
```

Se generó un clon de cDNA que contenía el genoma completo de RSV, un promotor de T7, una ribozima del virus delta de la hepatitis y un terminator de T7. Esta construcción puede ser utilizada para generar RSV o RNA antígeno *in vivo* en presencia de polimerasa de T7. Un análisis de secuencias indicó que el plásmido contenía pocas mutaciones en el genoma de RSV.

6.2.1. Modificaciones del genoma de RSV

Por ejemplo, los genes F y G del RSV del subgrupo B humano se podían insertar en un genoma distinto de la cepa A de RSV (en lugar o además de los genes F y G de la cepa A de RSV).

Estas modificaciones comprenden además la delección del marco de lectura abierto M2-2.

6.3. Rescate de un cDNA que representa el genoma completo de RSV

6.3.1. Construcción y análisis funcional de plásmidos de expresión

Los genes N, P y L de RSV codifican la polimerasa vírica de RSV. Se desconoce la función de los genes M de RSV. La capacidad de los plásmidos de expresión de N, P, M y L de RSV para desempeñar la función de proteínas auxiliares de la cepa A2 de RSV fue evaluada del modo descrito a continuación. Los genes N, P, L y M2-1 de RSV fueron clonados en el vector pCITE-2a(+) modificado (Novagen, Madison, Wisconsin, EE.UU.) bajo el control del promotor de T7 y fueron flanqueados por un terminator de T7 en su extremo 3'. Se modificó pCITE-2a(+) por inserción de una secuencia terminadora de T7 procedente de pCITE-3a(+) en los sitios AlwI y Bgl II de pCITE-2a(+). La funcionalidad

de los plásmidos de expresión de N, P y L fue determinada por su capacidad para replicar el plásmido pRSVA2CAT transfectado. Con una confluencia de aproximadamente 80%, se infectaron células HEp-2 con MVA en placas de seis pocillos, con una moi de 5. Después de 1 hora, las células infectadas fueron transfectadas con pRSVA₂CAT (0,5 mg) y plásmidos que codificaban los genes N (0,4 mg), P (0,4 mg) y L (0,2 mg) usando LipofectACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se desarrolló la transfección durante 5 h o durante la noche y luego se substituyó el medio de transfección por medio MEM fresco que contenía FBS (suero bovino fetal) al 2%. Dos días después de la infección, se lisaron las células y se analizó la actividad CAT de los lisados usando un sistema de ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorption assay) para CAT, de Boehringer Mannheim. Se detectó actividad CAT en las células que habían sido transfectadas con los plásmidos de N, P y L junto con pRSVA₂CAT. Sin embargo, no se detectó actividad CAT cuando se prescindió de uno cualquiera de los plásmidos de expresión. Además, la cotransfección con RSV-GFP-CAT y los plásmidos de expresión de N, P y L dio lugar a la expresión tanto de la proteína GFP como de la proteína CAT. Se optimizaron las relaciones de los diferentes plásmidos de expresión y la moi del virus vaccinia recombinante en el sistema de expresión de genes informadores.

6.3.2. Recuperación de RSV infeccioso a partir del cDNA completo de RSV

Se infectaron células HEp-2 con MVA (virus vaccinia recombinante que expresa polimerasa de T7), con una moi de uno. Cincuenta minutos más tarde, se añadió la mezcla de transfección a las células. La mezcla de transfección consistía en 2 µg del vector de expresión de N, 2 µg del vector de expresión de P, 1 µg del vector de expresión de L, 1,25 µg del vector de expresión de M2/ORF1, 2 µg del clon genómico de RSV con promotor potenciado, 50 µl de LipofectACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) y 1 ml de OPTI-MEM. Un día más tarde, la mezcla de transfección fue substituida por MEM que contenía suero de ternera fetal (FCS; del inglés, fetal calf serum) al 2%. Las células fueron incubadas a 37°C durante 2 días. El sobrenadante de la transfección fue recolectado y fue utilizado para infectar células HEp-2 frescas en presencia de 40 µg/ml de araC (fármaco contra virus vaccinia). Las células HEp-2 infectadas fueron incubadas durante 7 días. Después de la recolección del sobrenadante P1, las células fueron utilizadas para inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra la proteína F de la cepa A2 de RSV. Se identificaron seis loci positivamente teñidos, con visible fusión célula-célula (típica de la infección por RSV). El RNA fue extraído del sobrenadante P1 y fue utilizado como molde para un análisis por RT-PCR. Se generaron productos de PCR que correspondían a las regiones F y M2; ambos productos contenían los marcadores introducidos. En el testigo, los productos de PCR derivados del virus RSV natural carecían de los marcadores.

Se creó una mutación puntual en la posición 4 de la secuencia líder del clon genómico de RSV (resto C a G), y este clon genómico fue denominado pRSVC4GLwt. Se había mostrado que este clon, en un contexto de gen informador, aumenta varias veces la actividad promotora en comparación con el tipo silvestre. Después de la introducción de esta mutación en el genoma de longitud completa, se rescató el virus infeccioso del clon de cDNA. El virus RSV recombinante rescatado formaba placas de lisis más pequeñas que el virus RSV de tipo silvestre (Figura 8).

Este sistema permite el rescate de RSV mutado. Por lo tanto, puede ser una herramienta excelente para construir vacunas vivas atenuadas contra RSV y para utilizar virus y vectores de RSV para conseguir la expresión de genes heterólogos. Puede que sea posible la expresión de la proteína G del RSV de tipo B en el fondo de tipo A, para que la vacuna sea capaz de proteger contra una infección por RSV tanto del tipo A como del tipo B. Puede que también sea posible conseguir mutaciones sensibles a la atenuación y la temperatura en el genoma de RSV por cambio del orden de los genes o mediante una mutagénesis, dirigida al sitio, de la proteína L.

6.4. Uso de anticuerpos monoclonales para diferenciar el virus rescatado del virus auxiliar

Con objeto de neutralizar el virus auxiliar de la cepa B9320 de RSV y facilitar la identificación del RSV de la cepa A2 rescatado, se prepararon anticuerpos monoclonales contra la cepa B9320 de RSV del modo siguiente. Se infectaron intranasalmente (i.n.) seis hembras de ratón BALB/c con 10⁵ unidades formadoras de placa (pfu) de RSV B9320, lo que fue seguido, 5 semanas más tarde, de la inoculación intraperitoneal (i.p.) de 10⁶-10⁷ pfu de RSV B9320 en una mezcla que contenía adyuvante completo de Freund al 50%. Dos semanas después de la inoculación i.p., se analizó la presencia de un anticuerpo específico de RSV en una muestra de sangre de cada ratón, usando un ensayo de neutralización estándar [Beeler y Coelingh, J. Virol. 63: 2941-2950 (1988)]. Los ratones que producían el nivel más elevado de anticuerpo neutralizante fueron luego adicionalmente reforzados con 10⁶ pfu de la cepa B9320 de RSV en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline), inyectadas intravenosamente en la base de la cola. Tres días más tarde, se sacrificaron los ratones y se recogieron sus bazo como fuente de células B productoras de anticuerpos monoclonales. Los esplenocitos (incluyendo células B) fueron arrancados del bazo del ratón por medio de incisiones realizadas en la cápsula esplénica, en 5 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME; del inglés, Dulbecco's modified Eagle's medium). Se dejó que los agregados celulares sedimentaran y se recogieron separadamente las células suspendidas restantes por centrifugación a 2000xg durante 5 minutos a temperatura ambiental. Se resuspendieron estos sedimentos celulares de centrifugación en 15 ml de NH₄Cl al 0,83% (peso/volumen) y se dejó reposar la suspensión durante 5 minutos para lisar los glóbulos rojos. Luego se recogieron los esplenocitos mediante una centrifugación como la anterior a través de un lecho de 10 ml de suero de ternera fetal. Los esplenocitos fueron luego enjuagados en DME, vueltos a recoger como sedimento de centrifugación y finalmente resuspendidos en 20 ml de DME fresco. Estos esplenocitos fueron luego mezclados con células Sp2/0 (una línea celular de mieloma de ratón, usada como pareja de fusión para la inmortalización de esplenocitos) en una relación de células esplénicas:células Sp2/0 = 10:1. Las células Sp2/0 fueron obtenidas de la ATCC y fueron mantenidas en DME complementado con suero bovino fetal al 10%. La mezcla de células fue luego centrifugada durante 8 minutos a

2000xg, a temperatura ambiental. El sedimento celular fue resuspendido en 1 ml de polietilenglicol 1000 (PEG 1000; peso molecular de 1000) al 50%, lo que fue seguido de la adición de volúmenes iguales de DME en intervalos de 1 minuto hasta que se alcanzó un volumen final de 25 ml. Las células fusionadas fueron luego recogidas como sedimento de centrifugación del modo anterior y fueron resuspendidas, en una concentración de $3,5 \times 10^6$ células esplénicas/ml, en medio de crecimiento [medio acondicionado procedente de células Sp2/0, al 50%, y medio HA al 50% que contenía 100 ml de medio RPMI, 25 ml de FCS, 100 μ g de gentamicina/ml, y 4 ml de medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) 50x suministrado por Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri, EE.UU., como una mezcla preparada]. La suspensión celular fue distribuida sobre placas de 96 pocillos (200 μ l/pocillo) y fue incubada a 37°C, con humedad de 95% y CO₂ al 5%. Las colonias de hibridomas (células Sp2/0 y esplenocitos fusionados) fueron luego subcultivadas en placas de 24 pocillos y fueron dejadas crecer hasta casi la confluencia. Luego se muestreó el sobrenadante del medio de cultivo en cuanto a la presencia de anticuerpo monoclonal neutralizante de la cepa B9320 de RSV, usando un ensayo de neutralización estándar [Beeler y Coelingh, J. Virol. 63: 2941-50 (1988)]. Los hibridomas de los pocillos con actividad neutralizante fueron resuspendidos en medio de crecimiento, y la suspensión fue diluida hasta obtener una densidad celular de 0,5 células por 100 μ l y fue sembrada en placas de 96 pocillos (200 μ l por pocillo). Este procedimiento aseguró la producción de monoclonos (es decir, líneas de hibridoma derivadas de una sola célula), que fueron luego vueltos a analizar en cuanto a la producción de anticuerpo monoclonal neutralizante. Luego se infectaron i.p. ratones (10^6 células por ratón) con aquellas líneas de hibridoma que producían anticuerpo monoclonal capaz de neutralizar la cepa B9320 de RSV pero no la cepa A2 de RSB. Dos semanas después de la inyección i.p., se extrajo a los ratones fluido ascítico, que contenía anticuerpo monoclonal neutralizante para la cepa B9320 de RSV, con una aguja de calibre 19 y se almacenó a -20°C.

Este anticuerpo monoclonal fue utilizado para neutralizar el virus auxiliar de la cepa B9320 de RSV después del rescate de la cepa A2 de RSV, como se describe en la Sección 9.1. Esto fue llevado a cabo diluyendo 1 del anticuerpo monoclonal neutralizante con 50 de agar fundido al 0,4% (peso/volumen) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) que contenía FCS al 1%. Esta mezcla fue luego añadida a monocapas de células HEp-2 que habían sido infectadas con la progenie de experimentos de rescate, con una moi de 0,1-0,01 pfu por célula. El anticuerpo monoclonal de la capa de agar inhibía el crecimiento de la cepa B9320 de RSV pero permitía el crecimiento de la cepa A2 de RSV, lo que daba lugar a la formación de placas de lisis por la cepa A2. Estas placas fueron recogidas usando una pipeta Pasteur para separar un tapón de agar sobre la placa y las células infectadas de la placa; las células y el tapón de agar fueron resuspendidos en 2 ml de EMEM con FCS al 1%, y el virus liberado fue sometido de nuevo a formación de placas de lisis sobre una monocapa de células HEp-2 frescas en presencia de anticuerpo monoclonal, para purificarlo más del virus auxiliar. El virus doblemente sometido a formación de placas de lisis fue luego utilizado para infectar células HEp-2 en placas de 24 pocillos, y su progenie fue utilizada para infectar placas de seis pocillos con una moi de 0,1 pfu por célula. Finalmente, el RNA total de las células infectadas procedente de un pocillo de una placa de seis pocillos fue utilizado en una reacción RT/PCR usando cebadores de cadenas primera y segunda en ambos lados de las “secuencias marcadoras” (introducidas en el genoma de la cepa A2 de RSV para que actuaran como un medio para reconocer procesos de rescate), como se describió antes en la Sección 6.2. El DNA producido mediante la reacción RT/PCR fue posteriormente sometido a digestión con Stu I y Pme I para identificar positivamente las “secuencias marcadoras” introducidas en el cDNA de la cepa A2 de RSV y, de este modo, establecer la validez del procedimiento de rescate.

8. Ejemplo

Expresión de proteínas G y F del subgrupo B de RSV por la cepa A2 de RSV

Se llevaron los siguientes experimentos a cabo para generar un RSV quimérico que expresara los polipéptidos antigénicos de más de una cepa de RSV. Dos subgrupos antigénicos principales (A y B) del virus respiratorio sincitial (RSV) causan enfermedades humanas. Las glicoproteínas F y G son los dos determinantes antigénicos principales del RSV. Se estima que las glicoproteínas F de los virus de los subgrupos A y B están relacionadas en un 50%, mientras que la relación de las glicoproteínas G es considerablemente menor, aproximadamente 1-5%. La infección por RSV del subgrupo A induce resistencia parcial o falta de resistencia a la replicación de una cepa del subgrupo B, y viceversa. Para proteger de la infección por RSV se necesitan vacunas de virus RSV tanto del subgrupo A como del subgrupo B.

El primer planteamiento aquí descrito es preparar un clon infeccioso quimérico de cDNA de RSV que exprese antígenos del subgrupo B, al sustituir las regiones G y F del clon infeccioso actual de cDNA de RSV A2 por los genes G y F del subgrupo B. El RSV quimérico sería antigénicamente específico del subgrupo B. El segundo planteamiento aquí descrito es insertar un gen G del subgrupo B en el actual clon de cDNA de A2 para que un virus expresara ambos antígenos específicos de los subgrupos A y B.

8.1. Sustitución de genes G y F de A2 por genes G y F de B9320

Los genes G y F de la cepa B9320 del subgrupo B de RSV fueron multiplicados a partir del RNA vírico de B9320 por RT/PCR y fueron clonados en el vector pCRII para la determinación de secuencias. Se creó un sitio BamH I en los cebadores oligonucleotídicos utilizados para la RT/PCR con objeto de clonar los genes G y F de la cepa B9320 en cDNA antigenómico de A2 (Figura 4A). Primero se subclonó un fragmento de cDNA que contenía los genes G y F de la cepa A2, del nt 4326 al nt 9387, en pUC19 (pUCR/H). Se crearon sitios Bgl II en las posiciones 4630 (juntura intergénica SH/G) y 7554 (juntura intergénica F/M2), respectivamente, mediante el sistema QuickChange (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) para mutagénesis dirigida al sitio. El cDNA de G y F de B9320 insertado en el vector

pCRII fue sometido a digestión con la enzima de restricción BamH I y fue luego subclonado en pUCR/H sometido a digestión con Bgl II, al que se habían quitado los genes G y F de A2. El clon de cDNA con los genes G y F de A2 sustituidos por G y F de B9320 fue utilizado para reemplazar la región Xho I a Msc I del cDNA antigenómico de longitud completa de A2. El clon de cDNA antigenómico resultante fue denominado pRSVB-GF y fue usado para

transfectar células HEp-2, para generar el virus RSVB-GF infeccioso.

La generación del virus RSVB-GF quimérico fue del modo siguiente. Se usó pRSVB-GF, junto con plásmidos que codificaban las proteínas N, P y L, para transfectar células HEp-2 que habían sido infectadas con MVA, un virus vaccinia recombinante que expresa la RNA polimerasa de T7. Un día antes de la transfección, las células HEp-2 fueron repartidas en placas de seis pocillos. Monocapas de células HEp-2 en 60%-70% de confluencia fueron infectadas con MVA, con una moi de 5, y fueron incubadas a 35°C durante 60 minutos. Las células fueron luego lavadas una vez con OPTI-MEM (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se repuso 1 ml de OPTI-MEM en cada placa y se añadieron 0,2 ml de medio de transfección. El medio de transfección fue preparado mezclando cinco plásmidos, es decir, 0,6 µg de pRSVB-GF antigenómico de RSV, 0,4 µg de plásmido N, 0,4 µg de plásmido P y 0,2 µg de plásmido L, en un volumen final de 0,1 ml de medio OPTI-MEM. Esta mezcla fue combinada con 0,1 ml de OPTI-MEM que contenía 10 µl de LipofectACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiental, se añadió el DNA/LipofectACE a las células y, un día más tarde, se substituyó el medio por MEM que contenía FBS al 2%. Se incubaron adicionalmente los cultivos a 35°C durante 3 días y se recolectaron los sobrenadantes. Luego se utilizaron partes alícuotas de los sobrenadantes de los cultivos para infectar células HEp-2 frescas. Después de una incubación a 35°C durante 6 días, el sobrenadante fue recolectado y las células fueron fijadas y fueron teñidas mediante un método indirecto con peroxidasa de rábano picante, usando un anticuerpo de cabra anti-RSV (Biogenesis, Sandown, New Hampshire, EE.UU.) seguido de un anticuerpo anti-cabra generado en conejo, unido a peroxidasa de rábano picante. Las células infectadas con el virus fueron luego detectadas mediante la adición de un sustrato cromógeno (DAKO, Carpinteria, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En las células que habían sido infectadas con los sobrenadantes de las células transfectadas con pRSVB-GF se detectaron placas de lisis de tipo RSV. El virus fue adicionalmente purificado dos veces por formación de placas de lisis y fue multiplicado en células HEp-2.

El virus RSVB-GF recombinante fue caracterizado por RT/PCR usando cebadores específicos para el subgrupo B de RSV. Se extrajeron dos productos de aislamiento del virus RSVB-GF recombinante independientemente purificados, mediante un sistema de extracción de RNA (Tel-Test, Friendswood, Texas, EE.UU.), y se precipitó el RNA mediante isopropanol. Los RNAs viriónicos fueron hibridados con un cebador que abarcaba la región de los nt 4468 a 4492 de RSV y fueron incubados durante 1 hora bajo condiciones de RT estándares (mezclas de reacción de 10 µl) utilizando transcriptasa inversa Superscript (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se sometieron partes alícuotas de cada mezcla de reacción a PCR (30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos) usando cebadores específicos para el subgrupo B en la región G (CACCACCTACCTTACT-CAAGT y TTTGTTTGTGGGTTTGATGGTTGG). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Como se muestra en la Figura 5, no se produjo producto de DNA alguno en las reacciones de RT/PCR al usar la cepa A2 de RSV como molde. Sin embargo, se detectó un previsto producto de 254 bp en las reacciones de RT/PCR al utilizar RNA de RSVB-GF o el plásmido testigo de la PCR, DNA de pRSVB-GF, como molde, lo que indica que el virus rescatado contenía genes G y F procedentes del virus B9320.

8.2. Expresión de B9320G por el virus RSV A2

El gen G de la cepa B9320 del subgrupo B de RSV fue multiplicado por RT/PCR a partir de RNA vírico (vRNA) de B9320 y fue clonado en el vector pCRII para la determinación de la secuencia. Se incorporaron dos sitios Bgl II a los cebadores de PCR que también contenían señales de inicio de gen y final de gen (GATATCAAGATCTACAA-TAACATTGGGGCAAATGC y GCTAAGAGATCTTTTTGAATAACTAAGCATG). El inserto de cDNA B9320G fue sometido a digestión con Bgl II y fue clonado en la juntura intergénica SH/G (nt 4630) o F/M2 (nt 7552) de un subclon de cDNA de A2 (Figuras 4B y 4C). El fragmento Xho I a Msc I que contenía la inserción B9320G en la región intergénica SH/G o F/M2 fue utilizado para reemplazar la correspondiente región Xho I a Msc I del cDNA antigenómico de A2. El clon de cDNA antigenómico de RSV resultante fue denominado pRSVB9320G-SH/G o pRSVB9320G-F/M2.

La generación de un virus RSV A2 que tenía un gen G de B9320 insertado en la región intergénica F/M2 fue llevada a cabo de una manera similar a la descrita para la generación del virus RSVB-GF. En resumen, se usó pRSVB9320G-F/M2, junto con plásmidos que codificaban las proteínas N, P y L, para transfectar células HEp-2 infectadas con un virus vaccinia MVA recombinante que expresa la RNA polimerasa de T7 (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Un día después de la transfección, se substituyó el medio de las células transfectadas por MEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 2% y se realizó una incubación adicional durante tres días a 35°C. Luego se utilizaron partes alícuotas de los sobrenadantes de los cultivos (PO) para infectar células HEp-2 frescas. Después de una incubación a 35°C durante 6 días, el sobrenadante fue recolectado y las células fueron fijadas y fueron teñidas mediante un método indirecto con peroxidasa de rábano picante, usando un anticuerpo de cabra anti-RSV (Biogenesis) seguido de un anticuerpo anti-cabra generado en conejo, unido a peroxidasa de rábano picante. Las células infectadas con el virus fueron luego detectadas mediante la adición de un sustrato cromógeno (Dako). En las células que habían sido infectadas con los sobrenadantes de las células transfectadas con pRSVB9320G-F/M2 se detectaron placas de lisis de tipo RSV.

La caracterización del virus pRSVB9320G-F/M2 fue llevada a cabo por RT/PCR usando cebadores específicos para B9320G. Se vio un previsto producto de PCR de 410 bp en la muestra de RT/PCR al utilizar el RNA de pRSVB9320G-F/M2 como molde, lo que indica que el virus rescatado contenía el gen G procedente de B9320 (Figura 6).

La expresión del gen G insertado de RSV B9320 fue analizada por transferencia Northern usando un oligonucleótido marcado con ^{32}P y específico para el mRNA de A2-G o B-G. Se extrajo el RNA celular total de células HEP-2 infectadas con RSV B9320 de tipo silvestre, rRSVA2 o rRSVB9320G-F/M2, 48 horas después de la infección, usando un sistema para extracción de RNA (RNA Stat-60, Tel-Test). El RNA fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído y fue transferido a una membrana de nailon (Amersham). Se marcaron un oligonucleótido específico para el gen G de la cepa A2 (5'-TCTTGACTGTTGTGGATTGCAGGGTTGACTTGACTCCGATCCGATCC-3') y un oligonucleótido específico para el gen G de B9320 (5'-CTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTCTGATTTTGTATTGATCGATCC-3') con ^{32}P -ATP mediante una reacción de fosforilación conocida por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. La hibridación de la membrana con uno de los oligonucleótidos específicos para el gen G, marcados con ^{32}P , fue llevada a cabo a 65°C, realizándose el lavado de acuerdo con el procedimiento estándar. Se detectaron tanto RNA específico de A2-G como RNA específico de B9320-G en las células HEP-2 infectadas con rRSVB9320G-F/M2 (Figura 6B). Estos resultados demuestran la expresión de RNA específica del subtipo.

Se comparó la expresión proteica del rRSVA2(B-G) quimérico con la de RSV B9320 y rRSV mediante inmunoprecipitación de lisados de células HEP-2 infectadas, marcadas con ^{35}S . En resumen, de 14 horas a 18 horas después de la infección, las células infectadas con virus fueron marcadas con ^{35}S -Promix (3700 kBq/ml de ^{35}S -Cys y ^{35}S -Met; Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.) de acuerdo con un protocolo conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Las monocapas celulares fueron lisadas mediante tampón RIPA, y los polipéptidos fueron inmunoprecipitados con antisuero policlonal generado en cabra contra el virus RSV A2 deshecho con detergente (Figura 7, carriles 1-4) o con antisuero generado en ratón contra viriones B9320 no deshechos (Figura 7, carriles 5-8). Los polipéptidos radiomarcados inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% que contenían dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, sodium dodecyl sulfate) al 0,1% y fueron detectados por autorradiografía. El suero anti-RSV A2 inmunoprecipitó los principales polipéptidos de la cepa A2 de RSV, mientras que el suero anti-B9320 reaccionó principalmente con la proteína G de RSV B9320 y la proteína F conservada de ambos subgrupos, A y B. Como se muestra en la Figura 7, al utilizar un antisuero contra RSV A2 se inmunoprecipitó de las células infectadas con rRSVA2(B-G) (carril 4) una proteína que era idéntica a la proteína A2-G (carril 3). La proteína G de la cepa B9320 de RSV no fue reconocida por el antisuero anti-A2. Al usar el antisuero contra viriones B9320 generado en ratón, inmunoprecipitó de las células infectadas tanto con B9320 (carril 6) como con rRSVA2(B-G) (carril 9) una especie proteica más pequeña que la proteína A2-G. Este polipéptido no estaba presente en las células no infectadas ni en las células infectadas con RSV A2, y es probable que represente la proteína G específica para la cepa B9320 de RSV. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas G tanto de RSV A2 como de RSV B9320 indicó que en la proteína RSV A2G estaban presentes dos posibles sitios de N-glicosilación adicionales (N-X-S/t), lo cual puede contribuir a la migración más lenta de la proteína G de A2 bajo las condiciones usadas. La proteína F de RSV B9320 también migraba ligeramente más rápida que la proteína F de RSV A2. Las proteínas P y M de los dos subtipos virales también mostraron diferencias de movilidad. No se conoce la identidad del polipéptido cercano a la parte superior del gel proteico, presente en las células infectadas con RSV B9320 y rRSVA2(B-G). Los antisueros generados en ratón contra los viriones RSV B9320 reconocían mal las proteínas N, P y M en comparación con el antisuero de cabra generado contra la cepa A2 de RSV. Los datos anteriormente descritos indican claramente que el rRSVA2(B-G) quimérico expresa proteínas G específicas tanto de RSV A2 como de RSV B9320.

8.2.1. Replicación de RSV recombinante en cultivo tisular

Los virus RS recombinantes fueron purificados tres veces por formación de placas de lisis y fueron multiplicados en células HEP-2. Los ensayos de placas de lisis se llevaron a cabo sobre células HEP-2 en placas de 12 pocillos, utilizando una capa de metilcelulosa al 1% y medio L15 1x que contenía FBS al 2%. Después de una incubación a 35°C durante 6 días, se fijaron las monocapas con metanol y se identificaron las placas de lisis por inmunotinción. El tamaño y la morfología de las placas de lisis de rRSV eran muy similares a los del RSV A2 de tipo silvestre (Figura 8). Sin embargo, las placas formadas por rRSVC4G eran más pequeñas que las de rRSV y las del virus A2 de tipo silvestre. La única diferencia genética entre rRSV y rRSVC4G era una sola sustitución nucleotídica en la región líder de RSV. Por lo tanto, el menor tamaño de placa de rRSVA2(B-G) no era distinguible del de rRSVC4G.

Se compararon las curvas de crecimiento de rRSV, rRSVC4G y rRSVA2(B-G) con la del virus A2 de tipo silvestre biológicamente derivado. Se cultivaron células HEP-2 en matraces T25 de cultivo y se infectaron con rRSV, rRSVC4G, rRSVA2(B-G) o la cepa A2 de RSV de tipo silvestre, con una moi de 0,5. Después de 1 hora de adsorción a 37°C, las células fueron lavadas tres veces con MEM que contenía FBS al 2% y fueron incubadas a 37°C en CO_2 al 5%. A intervalos de 4 horas después de la infección, se recogieron 250 μl del sobrenadante del cultivo y se guardaron a -70°C hasta la titulación del virus. Cada parte alícuota tomada fue sustituida por una cantidad igual de medio fresco. El título de cada virus fue determinado mediante un ensayo de placas de lisis sobre células HEP-2 y fue visualizado por inmunotinción (*vide supra*). Como se muestra en la Figura 9, la cinética de crecimiento del rRSV es muy similar a la del virus A2 de tipo silvestre. Para todos los virus, el título máximo se alcanzó en un periodo de entre 48 horas y 72 horas. El título vírico de rRSVC4G fue aproximadamente 2,4 veces (a las 48 horas) y 6,6 veces (a las 72 horas) menor que el de rRSV y el de RSV A2 de tipo silvestre. El mal crecimiento de rRSVC4G puede ser también debido al único

cambio de nucleótido en la región líder. El rRSVA2(B-G) quimérico mostró una cinética más lenta y un menor título máximo (Figura 9).

Generación de un candidato a vacuna de virus respiratorio sincitial (RSV) humano por supresión de los genes virales SH y M2ORF2

10.1. Mutante por delección de M2-2

Para suprimir los genes M2-2, se introdujeron dos sitios para la enzima de restricción Hind III en los nucleótidos 8196 y 8430 de RSV, respectivamente, de un subclon pET(S/B) de cDNA que contenía un fragmento de restricción de RSV, de 4478 a 8505. El fragmento de restricción de RSV había sido previamente preparado mediante el sistema QuikChange (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) para mutagénesis dirigida al sitio. La digestión de pET(S/B) con la enzima de restricción Hind III separó una secuencia de 234 nucleótidos que contenía la mayor parte del marco de lectura abierto M2-2. No se separaron los nucleótidos que codifican los 13 primeros aminoácidos del extremo N del producto del gen M2-2 porque esta secuencia solapa con M2-1. El fragmento de cDNA que contenía la delección del gen M2-2 fue sometido a digestión con SacI y BamHI y fue retroclonado en un clon de cDNA de RSV de longitud completa, denominado pRSVΔM2-2.

Se generó un RSV infeccioso con esta delección de M2-2 al usar el plásmido pRSVΔM2-2 para transfectar células HEp-2 infectadas con MVA que expresaban los genes N, P y L. En resumen, se utilizó pRSVΔM2-2, junto con plásmidos que codificaban las proteínas N, P y L, para transfectar células HEp-2 que habían sido infectadas con un virus vaccinia recombinante (MVA) que expresaba la RNA polimerasa de T7. La transfección y la recuperación del RSV recombinante fue llevada a cabo del modo siguiente. Cinco horas o un día antes de la transfección, las células HEp-2 fueron repartidas en placas de seis pocillos. Monocapas de células HEp-2 en 70%-80% de confluencia fueron infectadas con MVA, con una multiplicidad de infección (moi) de 5, y fueron incubadas a 35°C durante 60 minutos. Las células fueron luego lavadas una vez con OPTI-MEM (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se repuso 1 ml de OPTI-MEM en cada placa y se añadieron 0,2 ml de medio de transfección. El medio de transfección fue preparado mezclando 0,5-0,6 μg de antigenoma de RSV, 0,4 μg de plásmido N, 0,4 μg de plásmido P y 0,2 μg de plásmido L en un volumen final de 0,1 ml de medio OPTI-MEM. Esta mezcla fue combinada con 0,1 ml de OPTI-MEM que contenía 10 μl de LipofecTACE (Life Technologies). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiental, se añadió la mezcla de DNA/LipofecTACE a las células. Un día más tarde, se sustituyó el medio por MEM que contenía FBS al 2%. Se incubaron adicionalmente los cultivos a 35°C durante 3 días y se recolectaron los sobrenadantes. Tres días después de la transfección, se realizó el pase de 0,3-0,4 ml de sobrenadantes de cultivo sobre células HEp-2 frescas y se realizó una incubación con MEM que contenía FBS al 2%. Después de una incubación durante seis días, el sobrenadante fue recolectado y las células fueron fijadas y fueron teñidas mediante un método indirecto con peroxidasa de rábano picante, usando un anticuerpo de cabra anti-RSV (Biogenesis) seguido de un anticuerpo anti-cabra generado en conejo, unido a peroxidasa de rábano picante. Las células infectadas con el virus fueron luego detectadas mediante la adición de un sustrato cromógeno (DAKO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RSV recombinante que contenía la delección del gen M2-2 fue recuperado de las células transfectadas. La identificación de rRSVΔM2-2 fue llevada a cabo por RT/PCR usando cebadores que flanqueaban la región suprimida. Como se muestra en la Figura 12A, en las células infectadas con rRSVΔM2-2 se detectó un fragmento de cDNA que tenía 234 nucleótidos menos que el RSV de tipo silvestre. No se detectó cDNA en la reacción RT/PCR en cuya reacción de RT no había transcriptasa inversa. Esto indicaba que el producto de DNA procedía de RNA vírico y no de contaminación. Las propiedades del RSV con delección de M2-2 están siendo actualmente evaluadas.

10.3. Generación de un mutante por delección tanto de SH como de M2-2

Se suprimieron tanto el gen SH como el M2-2 de la construcción de cDNA de RSV de longitud completa por subclonación de cDNA. Un fragmento Sac I a BamH I que contenía la delección de M2-2, separado del subclon pET(S/B)ΔM2-2RSV de cDNA, fue clonado en el clon pRSVΔSH de cDNA. El plásmido pRSVΔSHΔM2-2 con doble delección génica fue confirmado por mapeo con enzimas de restricción. Como se muestra en la Figura 12B, el mutante por doble delección SH/M2-2 es más corto que el cDNA de pRSV de tipo silvestre. La recuperación del RSV infeccioso que contenía tanto la delección de SH como la de M2-2 fue llevada a cabo del modo anteriormente descrito. De las células HEp-2 transfectadas se obtuvo un virus infeccioso con delección tanto de SH como de M2-2.

11. Ejemplo

Generación de un candidato a vacuna de virus respiratorio sincitial (RSV) humano por delección de un(os) gen(es) accesorio(s) viral(es), individualmente o en combinación

Fundamento

El virus respiratorio sincitial humano es la causa principal de neumonía y bronquiolitis en niños con edad inferior a un año. El RSV es responsable de más de una de cada cinco admisiones hospitalarias pediátricas debidas a enfermedades del tracto respiratorio y, sólo en Estados Unidos, causa 4500 muertes al año. A pesar de decenios de investigación para desarrollar una vacuna eficaz contra el RSV, no se ha conseguido una vacuna segura y eficaz para evitar la grave morbilidad y la significativa mortalidad asociadas con la infección por RSV. Se han utilizado diversos planteamientos para desarrollar candidatos a vacuna de RSV: virus inactivado con formol, vacuna subunitaria recombinante de glico-

proteínas expresadas de RSV, y virus vivo atenuado. Recientemente, el desarrollo de vacunas de RSV se ha centrado en la generación de mutantes vivos atenuados de RSV. En el pasado, la generación de un mutante vivo atenuado de RSV sólo podía ser llevada a cabo mediante pases *in vitro* y/o mutagénesis química. El virus resultaba infraatenuado o sobreatenuado y no era genéticamente estable. La presente investigación proporciona un procedimiento inmediato para generar vacunas vivas atenuadas y genéticamente estables de RSV al suprimir un(os) gen(es) accesorio(s) individualmente o en combinación. Se considera que las deleciones génicas son una estrategia muy poderosa para atenuar RSV porque dichas deleciones no revertirán, y, por lo tanto, se espera que los mutantes de RSV recombinantes por delección sean genéticamente muy estables.

La organización génica del RSV es única entre los paramixovirus. Además de los genes N, P, L, M, G y F, que son comunes a todos los paramixovirus, el RSV contiene cuatro genes adicionales que codifican cinco proteínas: NS1, NS2, SH, M2-1 y M2-2. M2-1 y M2-2 son traducidos desde dos marcos de lectura abiertos que solapan en el centro del mRNA de M2. El M2-1 potencia la capacidad de procesamiento transcripcional del mRNA y también actúa como un factor antiterminación al aumentar la lectura transcripcional en las juntas intergénicas más allá de las señales de terminación normales ("readthrough") [P. L. Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 81-85 (1996); R. W. Hardy *et al.*, J. Virol. 72: 520-526 (1998)]. Sin embargo, se halló que la proteína M2-2 inhibía la transcripción y replicación del RNA del RSV *in vitro* [P. L. Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 81-85 (1996)]. Se ha comunicado que la proteína accesorio NS1 es un potente inhibidor de la transcripción [P. L. Atreya *et al.*, J. Virol. 72: 1452-1461 (1998)]. Se ha mostrado que, en un virus presente en la naturaleza y en un RSV recombinante que contiene una delección de SH creada, el gen SH es innecesario para el desarrollo de RSV en cultivo celular [A. Bukreyev *et al.*, J. Virol. 71 (12): 8973-82 (1997); R. A. Karron *et al.*, J. Infect. Dis. 176: 1428-1436 (1997)]. El RSV sin SH se replica *in vitro* también como el RSV de tipo silvestre. Se ha comunicado recientemente que también se podría suprimir el gen NS2 [M. N. Teng *et al.*, J. Virol. 73 (1): 466-73 (1999); U. J. Buchholz *et al.*, J. Virol. 73 (1): 251-9 (1999)]. No se ha comunicado la delección de M2-1, M2-2 ni NS1, ni se ha comunicado la delección de más de dos genes no esenciales.

Tradicionalmente, se generaban mutantes vivos atenuados de virus mediante muchos pases de RSV a baja temperatura y/o mediante mutagénesis con reactivos químicos. Las mutaciones se introducen aleatoriamente y es difícil mantener el fenotipo del virus porque se pueden desarrollar mutantes revertidos. La capacidad para producir un virus a partir de un cDNA infeccioso hace posible suprimir un gen o genes que están asociados con la patogénesis del virus. La delección génica, sola o en combinación con mutaciones en los demás genes víricos (G, F, M, N, P y L), puede producir una vacuna de RSV establemente atenuada que proteja eficazmente contra una infección por RSV.

11.1. Generación de un candidato a vacuna de virus respiratorio sincitial (RSV) humano por delección del gen M2-2 viral

En este ejemplo se describe la producción de un RSV recombinante en que se ha suprimido la expresión del gen M2-2 por eliminación de una secuencia polinucleotídica que codifica el gen M2-2, y de su proteína codificada. El gen M2-2 de RSV es codificado por el gen M2-2, y su marco de lectura abierto está parcialmente solapado por 12 aminoácidos con el marco de lectura abierto M2-1 5'-proximal [P. L. Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 81-85 (1996)]. El previsto polipéptido M2-2 contiene 90 aminoácidos, pero la proteína M2-2 no ha sido aún intracelularmente identificada. La proteína M2-2 infrarregula la transcripción y replicación del RNA de RSV en un sistema modelo minigenómico [P. L. Collins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11.563-11.567 (1995)]. No se conoce la significación de este efecto negativo sobre la transcripción y replicación del RNA de RSV en el ciclo de replicación viral.

11.1.1. Recuperación de RSV recombinante que carece del gen M2-2

Para producir un RSV recombinante que dejara de expresar la proteína M2-2, se suprimió el gen M2-2 de un clon de cDNA de RSV paterno (H. Jin *et al.*, Virology 251: 206-214 (1998)). El clon de cDNA antigenómico codifica un RNA antigenómico completo de la cepa A2 de RSV, que fue exitosamente utilizado para recuperar el RSV recombinante. Este cDNA antigenómico contiene un solo cambio de nucleótido en la región líder, en la posición 4, de C a G en su sentido antigenómico. La construcción del plásmido pA2ΔM2-2 implicaba un procedimiento de clonación de dos fases. Se introdujeron dos sitios para la enzima de restricción Hind III en los nucleótidos 8196 y 8430, respectivamente, de la secuencia de RSV de un subclon de cDNA (pET-S/B) que contenía el fragmento Sac I (nt 4477) a BamH I (nt 8504) de cDNA de RSV, usando el sistema de mutagénesis QuickChange (Stratagene). La digestión de este clon de cDNA con la enzima de restricción Hind III eliminó el fragmento Hind III de cDNA, de 234 nt, que contenía el gen M2-2. El restante fragmento Sac I a BamH I que no contenía el gen M2-2 fue luego clonado en un cDNA antigenómico de RSV, pRSVC4G. El plásmido resultante fue denominado pA2ΔM2-2.

Para recuperar el RSV recombinante con el marco de lectura abierto M2-2 suprimido, se usó pA2ΔM2-2, junto con plásmidos que codificaban las proteínas N, P y L de RSV bajo el control del promotor de T7, para transfectar células Hep-2 que habían sido infectadas con un virus vaccinia modificado que codifica la RNA polimerasa de T7 (MVA-T7). Después de 5 horas de incubación a 35°C de las células Hep-2 transfectadas, el medio fue sustituido por MEM que contenía FBS al 2% y las células fueron adicionalmente incubadas durante 3 días a 35°C. Los sobrenadantes de los cultivos de las células Hep-2 transfectadas fueron usados para infectar células Hep-2 o Vero frescas, para multiplicar el virus rescatado. La recuperación de rA2ΔM2-2 vino indicada por formación sincitial y fue confirmada por la tinción positiva de las células infectadas al usar un suero policlonal anti-RSV A2. El rA2ΔM2-2 recuperado fue purificado tres veces por formación de placas de lisis y fue multiplicado en células Vero. Para confirmar que rA2ΔM2-2 contenía

la delección del gen M2-2, se extrajo el RNA vírico del virus y se sometió a RT/PCR usando una pareja de cebadores que abarcaba el gen M2-2. El RNA vírico se extrajo del sobrenadante del cultivo de células infectadas con rA2ΔM2-2 y rA2 mediante un sistema de extracción de RNA (RNA STAT-50, Tel-Test, Friendswood, Texas, EE.UU.). El RNA vírico fue inversamente transcrito con transcriptasa inversa usando un cebador complementario de los nucleótidos 7430 a 7449 del genoma vírico. El fragmento de cDNA que abarcaba el gen M2-2 fue multiplicado por PCR con el cebador V1948 (nt 7486 a nt 7515 en sentido positivo) y el cebador V1581 (nt 8544 a nt 8525 en sentido negativo). El producto de la PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1,2% y fue visualizado mediante tinción con EtBr. Como se muestra en la Figura 13B, el rA2 de tipo silvestre produjo un producto de DNA de PCR que correspondía al previsto fragmento de 1029 nt, mientras que rA2ΔM2-2 produjo un producto de PCR de 795 nt, 234 nt más corto. La generación del producto de RT/PCR era dependiente de la fase de RT, lo que indica que procedía del RNA en lugar de proceder de la contaminación por DNA.

11.1.2. Síntesis de RNA del rA2ΔM2-2

La expresión de mRNA de las células infectadas con rA2ΔM2-2 o rA2 fue analizada mediante análisis por hibridación con transferencia Northern. Se extrajo el RNA celular total de las células infectadas con rA2ΔM2-2 o rA2 mediante un sistema de extracción de RNA (RNA STAT-60, Tel-Test, Friendswood, Texas, EE.UU.). El RNA fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído y fue transferido a una membrana de nailon (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, EE.UU.). La membrana fue hibridada con una ribosonda específica para genes de RSV, marcada con digoxigenina (Dig). Las bandas de RNA hibridado fueron visualizadas utilizando un sistema de detección de luminiscencia DIG para ácidos nucleicos (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana, EE.UU.). La hibridación de las membranas con las ribosondas fue realizada a 65°C; el lavado de las membranas y la detección de las señales se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos estándares. Para examinar la síntesis de mRNA del rA2ΔM2-2 y el rA2, se analizó, mediante hibridación por transferencia Northern, la acumulación del mRNA de M2 y de los demás productos de mRNA vírico en las células Vero infectadas. La hibridación de la transferencia con una sonda específica para el marco de lectura abierto M2-2 no permitió detectar señal alguna en las células infectadas con rA2ΔM2-2. Por el contrario, en las células infectadas con rA2ΔM2-2 se detectó un mRNA de M2 más corto al utilizar una ribosonda específica para el gen M2-1 (Figura 14A). Estas observaciones confirmaban que el gen M2-2 había sido suprimido de rA2ΔM2-2. También se examinó la acumulación de los otros nueve transcritos de mRNA de RSV y se halló que las cantidades de cada mRNA eran comparables entre las células infectadas con rA2ΔM2-2 y con rA2. En la Figura 14A también se muestran ejemplos de transferencias Northern sondadas con N, SH, G y F. También fue perceptible una migración ligeramente más rápida del mRNA bicistrónico de F-M2 a causa de la delección de la región M2-2.

Se había comunicado previamente que la proteína M2-2 era un potente regulador transcripcional negativo en un ensayo de replicación de minigenomas. Sin embargo, no parecía que la delección del gen M2-2 del virus afectara a la producción de mRNA vírico en las células infectadas. Para determinar si los niveles de RNA vírico antigenómico y genómico de rA2ΔM2-2 eran también similares a los de rA2, se examinó por hibridación Northern la cantidad de RNA vírico genómico y antigenómico producido en las células Vero y HEP-2 infectadas. La hibridación del RNA celular infectado total con una ribosonda del gen F marcada con ³²P, específica para el RNA de sentido genómico negativo, indicó que se producía mucho menos RNA genómico en las células infectadas con rA2ΔM2-2 en comparación con las infectadas con rA2 (Figura 14B). Se hibridó por duplicado una membrana con una ribosonda del gen F marcada con ³²P, específica para el RNA de sentido positivo. Se detectó muy poco RNA antigenómico en las células infectadas con rA2ΔM2-2, aunque la cantidad del mRNA de F en las células infectadas con rA2ΔM2-2 era comparable al correspondiente con rA2. Por lo tanto, parece que la síntesis del genoma y antigenoma de RSV estaba infrarregulada a causa de la delección del gen M2-2. Esta infrarregulación se vio tanto en células Vero como en HEP-2 y, por consiguiente, no dependía del tipo celular.

11.1.3 Síntesis proteica de rA2ΔM2-2

Puesto que no se ha identificado previamente la supuesta proteína M2-2 en células infectadas con RSV, fue necesario demostrar que la proteína M2-2 es realmente codificada por RSV y es producida en células infectadas. Se produjo un antisuero policlonal contra la proteína de fusión M2-2 que se expresaba en un sistema de expresión bacteriano. Para producir el antisuero contra la proteína M2-2 de RSV, un fragmento de cDNA que codificaba el marco de lectura abierto M2-2, del nt 8155 al nt 8430, fue multiplicado por PCR y fue clonado en el vector pRSETA (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Se transformaron células BL21-Gold(DE3)plysS (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) con pRSETA/M2-2 y, mediante IPTG, se indujo la expresión de la proteína M2-2 marcada con His. La proteína de fusión M2-2 fue purificada a través de columnas HiTrap de afinidad (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, EE.UU.) y fue utilizada para inmunizar conejos. Dos semanas después de una inmunización de refuerzo, se sangraron los conejos y se recogió el suero.

Las proteínas víricas específicas producidas por las células infectadas fueron analizadas por inmunoprecipitación de los extractos de células infectadas o por transferencia Western. Para el análisis por inmunoprecipitación, las células Vero infectadas se marcaron con ³⁵S-Promix (3700 kBq/ml de ³⁵S-Cys y ³⁵S-Met; Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.) 14 a 18 horas después de la infección. Las monocapas de células marcadas fueron lisadas mediante tampón RIPA, y los polipéptidos fueron inmunoprecipitados mediante un suero policlonal anti-RSV A2 (Biogenesis, Sandown, New Hampshire, EE.UU.) o un suero anti-M2-2. La inmunoprecipitación de los lisados de células Vero infectadas con rA2, con el anticuerpo anti-M2-2, produjo una banda proteica de aproximadamente 10 kDa, que tiene

el tamaño previsto para el polipéptido M2-2. Este polipéptido no fue detectado en las células infectadas con rA2ΔM2-2 (Figura 15A), lo que confirma que M2-2 es un producto proteico producido por RSV y que su expresión fue suprimida de rA2ΔM2-2. El patrón polipeptídico global de rA2ΔM2-2 era indistinguible del patrón de rA2. Sin embargo, se advirtió que, por inmunoprecipitación, se produjo algo más de proteínas P y SH en las células Vero infectadas con rA2ΔM2-2. No obstante, mediante el análisis por transferencia Western, se produjo una cantidad comparable de SH en las células infectadas con rA2ΔM2-2 o rA2 (Figura 15B).

Los polipéptidos inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliácridamida al 17,5% que contenían SDS al 0,1% y urea 4 M, y fueron detectados por autorradiografía. Para el análisis por transferencia Western, se infectaron células HEP-2 y Vero con rA2ΔM2-2 o rA2. En diversos momentos después de la infección, las células infectadas con virus fueron lisadas en tampón para lisis de proteínas, y los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis en geles de poliácridamida al 17,5% que contenían SDS al 0,1% y urea 4 M. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nailon. La inmunotransferencia fue llevada a cabo del modo descrito por Jin *et al.* [H. Jin *et al.*, *Embo J.* 16 (6): 1236-47 (1997)], usando un antisuero policlonal contra M2-1, NS1 o SH.

Se utilizó la transferencia Western para determinar la cinética de la síntesis proteica de rA2ΔM2-2 tanto en la línea celular Vero como en la HEP-2. Se infectaron células HEP-2 o Vero con rA2ΔM2-2 o rA2, con una moi de 0,5, y, en diversos momentos después de la infección, se recolectaron las células infectadas y se separaron los polipéptidos en un gel de poliácridamida al 17,5% que contenía urea 4 M. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nailon y fueron sondadas con antisueros policlonales contra las tres proteínas accesorias: M2-1, NS1 y SH. Las cinéticas de expresión proteica de las tres proteínas víricas fueron muy similares para rA2ΔM2-2 y rA2 tanto en células HEP-2 como en Vero (Figura 15B). La síntesis de la proteína NS1 se detectó 10 horas después de la infección, algo más pronto que M2-1 y SH porque la proteína NS1 corresponde al primer gen traducido y es un producto proteico muy abundante en las células infectadas. También se observó una cinética de síntesis proteica similar cuando la membrana fue sondada con un antisuero policlonal contra RSV (datos no mostrados). Se detectó una M2-1 comparable en las células infectadas con rA2ΔM2-2, lo que indica que la delección del marco de lectura abierto M2-2 no afectaba al nivel de la proteína M2-1, que es traducida por el mismo mRNA de M2.

11.1.4. Análisis del desarrollo de RSV recombinante en cultivo tisular

Para comparar la morfología de las placas de rA2ΔM2-2 con la de rA2, se infectaron células HEP-2 o Vero con cada virus y se cubrieron con un medio semisólido compuesto de metilcelulosa al 1% y medio L15 1x con FBS al 2%. Cinco días después de la infección, las células infectadas fueron inmunoteñidas con antisueros contra la cepa A2 de RSV. El tamaño de las placas fue determinado por medición de las placas a partir de imágenes microscópicas fotografiadas. La formación de placas de rA2ΔM2-2 en células HEP-2 y Vero fue comparada con la de rA2. Como se muestra en la Figura 16, rA2ΔM2-2 formaba placas con tamaño de punta de alfiler en las células HEP-2, observándose una reducción de aproximadamente 5 veces en el tamaño de las placas virales de rA2ΔM2-2 en comparación con el de rA2. Sin embargo, en las células Vero infectadas con rA2ΔM2-2 sólo se vio una ligera reducción del tamaño de las placas (30%).

Se llevó a cabo un estudio sobre cinética de desarrollo de rA2ΔM2-2 en comparación con la de rA2, en células tanto HEP-2 como Vero. Células cultivadas en placas de 6 cm fueron infectadas con rA2 o rA2ΔM2-2, con una moi de 0,5. Después de 1 hora de adsorción a temperatura ambiental, las células infectadas fueron lavadas tres veces con PBS, dispuestas en 4 ml de OPTI-MEM e incubadas a 35°C en una incubadora que contenía CO₂ al 5%. En diversos momentos después de la infección, se recogieron 200 μl del sobrenadante del cultivo y se guardaron a -70°C hasta la titulación del virus. Cada parte alícuota extraída fue sustituida por una cantidad igual de medio fresco. El título del virus fue determinado mediante un ensayo de formación de placas en células Vero, en placas de 12 pocillos, usando una capa de metilcelulosa al 1% y medio L15 1x que contenía FBS al 2%. Como se ve en la Figura 17, rA2ΔM2-2 mostró una cinética de desarrollo muy lenta, y el título máximo de rA2ΔM2-2 fue aproximadamente 2,5-3 log menor que el de rA2 en células HEP-2. En células Vero, rA2ΔM2-2 alcanzó un título máximo similar al de rA2. Para analizar la replicación del virus en diferentes células huésped, cada línea celular cultivada en placas de seis pocillos fue infectada con rA2ΔM2-2 o rA2, con una moi de 0,2. Tres días después de la infección, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se cuantificó el virus mediante un ensayo de formación de placas. Se examinó rA2ΔM2-2 en cuanto a sus propiedades de desarrollo en diversas líneas celulares que procedían de diferentes huéspedes con diferentes orígenes tisulares (Tabla 3). Se observó una replicación significativamente reducida de rA2ΔM2-2, dos órdenes de magnitud inferior a la de rA2, en células HEP-2, MRC-5 y Hela infectadas, todas de origen humano. Sin embargo, la replicación de rA2ΔM2-2 sólo estaba ligeramente reducida en células MDBK y LLC-MK2, que proceden de células renales bovinas y de mono rhesus, respectivamente.

TABLA 3

Niveles de replicación de rA2ΔM2-2 y rA2 en diversas líneas celulares

	Líneas celulares	Huésped	Origen tisular	Título del virus [$\log_{10}$ (pfu/ml)]	
				rA2	rA2ΔM2-2
5	Vero	Mono	Riñón	6,1	6,1
10	HEp-2	Ser humano	Laringe	6,2	4,3
	MDBK	Bovino	Riñón	6,1	5,5
15	MRC-5	Ser humano	Pulmón	5,5	3,0
	Hela	Ser humano	Cuello uterino	6,6	4,5
	LLC-MK2	Mono	Riñón	6,7	6,1

11.1.5. Replicación de rA2ΔM2-2 en ratones y ratas de milpa

Se determinó la replicación vírica *in vivo* en ratas de milpa (*S. hispidus*; Virion Systems, Rockville, Maryland, EE.UU.) y ratones Balb/c (Simonsen Lab., Gilroy, California, EE.UU.) de 12 semanas de edad y exentos de patógenos respiratorios. Se inocularon intranasalmente 10^6 pfu de rA2 o rA2ΔM2-2 por animal, en un inóculo de 0,1 ml, a ratones o ratas de milpa en grupos de 6 bajo anestesia suave por metoxiflurano. El día 4 después de la inoculación, se sacrificaron los animales mediante asfixia por CO_2 y se obtuvieron separadamente sus cornetes nasales y sus pulmones. Se homogeneizaron los tejidos y se determinaron los títulos virales mediante un ensayo de formación de placas en células Vero. Para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia protectora, se inoculó intranasalmente rA2, rA2ΔM2-2 o sólo medio a tres grupos de ratones el día 0. Tres semanas más tarde, se anestesiaron los ratones, se recogieron muestras de suero y se realizó una inoculación intranasal de estimulación, de 10^6 pfu de cepa A2 de RSV de tipo silvestre biológicamente obtenida. Cuatro días después de la estimulación, se sacrificaron los animales, se recogieron tanto los cornetes nasales como los pulmones, y se determinaron los títulos virales mediante un ensayo de formación de placas. Se determinaron los anticuerpos séricos contra la cepa A2 de RSV mediante un ensayo de reducción de placas del 60% [H. V. Coates *et al.*, Am. J. Epid. 83: 299-313 (1965)] y mediante la inmunotinción de las células infectadas por RSV.

TABLA 4

Replicación de rA2ΔM2-2 y rA2 en ratas de milpa

Virus	Título del virus ($\log_{10}$ pfu medio/g de tejido $\pm$ error estándar) ^a	
	Cornetes nasales	Pulmón
45 rA2	4,0 $\pm$ 0,33	5,5 $\pm$ 0,12
rA2ΔM2-2	< 1,4	< 1,4

^aEl día 0 se inmunizaron intranasalmente grupos de seis ratas de milpa con 10^6 pfu del virus indicado. El día 4 se determinó el nivel de replicación del virus de infección mediante un ensayo de formación de placas sobre las muestras indicadas y se determinó el $\log_{10}$ medio del título $\pm$ error estándar (SE; del inglés, *standard error*) por gramo de tejido.

Para evaluar los niveles de atenuación e inmunogenicidad de rA2ΔM2-2, se examinó la replicación de rA2ΔM2-2 en los tractos respiratorios superior e inferior de ratones y ratas de milpa. Se inocularon intranasalmente 10^6 pfu de rA2ΔM2-2 o rA2 a ratas de milpa en grupos de 6. Se sacrificaron los animales 4 días después de la inoculación, se recogieron y homogeneizaron sus cornetes nasales y tejidos pulmonares, y se determinaron los niveles de replicación viral en esos tejidos mediante un ensayo de placas. rA2ΔM2-2 presentaba una reducción de la replicación de al menos 2 log tanto en los cornetes nasales como en los pulmones de las ratas de milpa infectadas (Tabla 4). No se detectó replicación viral en las ratas de milpa infectadas con rA2ΔM2-2, mientras que se detectó un nivel elevado de replicación del virus rA2 de tipo silvestre tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior de las ratas de milpa. También se observó atenuación de rA2ΔM2-2 en los ratones. En la Tabla 5 se muestran el título medio geométrico de la replicación viral y el error estándar obtenidos de dos experimentos. Sólo se detectó replicación de rA2ΔM2-2 en uno o dos de 12 ratones infectados. La replicación era limitada; sólo se observaron unas pocas placas con la dilución 10^{-1} de los productos de homogeneización celular. A pesar de su replicación limitada en ratones, rA2ΔM2-2 inducía una resistencia significativa a la estimulación con RSV A2 de tipo silvestre (Tabla 5). Cuando se inoculó

intranasalmente una dosis de 10^6 pfu de cepa A2 de tipo silvestre a ratones a los que se había inoculado previamente rA2ΔM2-2 o rA2, no se detectó replicación del virus A2 de tipo silvestre en los tractos respiratorios superior e inferior de los ratones. Por lo tanto, rA2ΔM2-2 resultó totalmente protector frente a la estimulación del virus A2 de tipo silvestre. También se examinó la inmunogenicidad de rA2ΔM2-2. Se infectaron dos grupos de ratones con rA2ΔM2-2 o rA2 y, tres semanas más tarde, se recogieron muestras de suero. Se determinó el título de neutralización sérico mediante el título de reducción de placas del 50%. El título de neutralización de los ratones infectados con rA2ΔM2-2 era comparable al correspondiente a rA2; ambos presentaban un título de reducción de placas del 60% para una dilución 1:16. El suero obtenido de ratones infectados con rA2ΔM2-2 también era capaz de inmunotestear placas de RSV, lo que confirma que se producían anticuerpos específicos de RSV en los ratones infectados con rA2ΔM2-2.

TABLA 5

Replicación de rA2ΔM2-2 y rA2 en ratones y protección frente a la estimulación por RSV A2 de tipo silvestre

Virus inmunizante	Replicación viral ^a ($\log_{10}$ pfu medio/g de tejido $\pm$ SE)		Replicación de RSV A2 tras la estimula- ción ^b ($\log_{10}$ pfu medio/g de tejido $\pm$ SE)	
	Cornetes nasales	Pulmón	Cornetes nasales	Pulmón
rA2	3,72 $\pm$ 0,33	4,0 $\pm$ 0,13	< 1,4	< 1,4
rA2ΔM2-2	< 1,4	< 1,4	< 1,4	< 1,4
Testigo	< 1,4	< 1,4	3,53 $\pm$ 0,17	4,10 $\pm$ 0,13

^aEl día 0 se inmunizaron intranasalmente grupos de 12 ratones Balb/c con 10^6 pfu del virus indicado. El día 4 se determinó el nivel de virus de infección en los tejidos indicados mediante un ensayo de formación de placas y se determinó el $\log_{10}$ medio del título $\pm$ error estándar (SE) por gramo de tejido.

^bSe administraron intranasalmente 10^6 pfu de RSV A2 a grupos de 6 ratones Balb/c el día 21 y se sacrificaron éstos 4 días más tarde. Se determinó la replicación del RSV A2 de tipo silvestre en los tejidos indicados mediante un ensayo de formación de placas y se determinó el $\log_{10}$ medio del título $\pm$ error estándar (SE) por gramo de tejido.

Los dos subgrupos antigénicos de RSV, A y B, muestran un grado de conservación relativamente elevado en las proteínas M2-2, lo que sugiere la importancia funcional de la proteína M2-2. El análisis transcripcional de rA2 y rA2ΔM2-2 proporcionó unos hallazgos importantes en el presente ejemplo. Aunque los niveles globales de transcripción de mRNA eran sustancialmente iguales para ambos virus, un análisis por transferencia Northern reveló una drástica reducción del RNA genómico y antigenómico viral para rA2ΔM2-2 en comparación con el rA2 de tipo silvestre. Este hallazgo es contradictorio con lo que se ha comunicado en cuanto a la regulación transcripcional negativa de la proteína M2-2 en un sistema minigenómico. Por lo tanto, parece que el papel funcional de M2-2 en el ciclo vital del virus es más complicado que el previamente pensado. No obstante, no parecía que la reducción en el nivel de genoma y antígeno de rA2ΔM2-2 afectara a las producciones víricas en las células Vero infectadas.

El hallazgo de que rA2ΔM2-2 presentaba una replicación restringida al tipo de huésped en diferentes líneas celulares proporcionó una buena indicación de que la delección de un gen no esencial es un buen medio para crear un mutante específico de huésped, lo cual puede ser una característica muy importante para cepas de vacunas. El rA2ΔM2-2 no se replicó bien en diversas líneas celulares de origen humano, alcanzándose una menor producción vírica en estas líneas celulares. Sin embargo, los niveles de síntesis proteica en células HEp-2 eran similares a los de células Vero que producían niveles elevados de rA2ΔM2-2. Esto indicaba que el defecto en la liberación vírica se debía probablemente a un defecto en una fase posterior, probablemente durante el proceso de ensambladura del virus.

El hallazgo de que el virus sin M2-2 se desarrolla bien en células Vero y presenta atenuación en los tractos respiratorios superior e inferior de ratones y ratas de milpa presenta nuevas ventajas para el desarrollo de vacunas. La replicación reducida en los tractos respiratorios de roedores no afectó a la inmunogenicidad ni a la protección frente a la replicación del virus estimulante de tipo silvestre, lo que indica que este virus sin M2-2 puede servir como una buena vacuna para uso humano. La naturaleza de la mutación por delección de M2-2, que supone una delección de 234 nucleótidos, representa un tipo de mutación que será muy refractaria a la reversión.

11.5. Generación de un candidato a vacuna de virus respiratorio sincitial (RSV) humano por delección de los genes M2-2 y SH virales

En este ejemplo se describe la producción de un RSV recombinante en el que se ha suprimido la expresión de dos genes de RSV, M2-2 y SH, por eliminación de secuencias polinucleotídicas que codifican los genes M2-2 y SH y sus proteínas codificadas. Como se describió previamente, el gen M2-2 o SH es innecesario para la replicación de RSV *in vitro*. Es posible que la delección de dos genes accesorios produzca un RSV recombinante con un diferente fenotipo de atenuación. Se puede aumentar o disminuir el grado de atenuación a partir de la delección de dos genes.

Se suprimieron los genes SH y M2-2 de la construcción de cDNA de RSV de longitud completa, por medio de clonación de cDNA. Un fragmento Sac I a BamH I que contenía la delección de M2-2 en el subclon pET(S/B), como se describió previamente, fue separado por digestión con las enzimas de restricción Sac I y BamH I y fue clonado en el clon de cDNA antígeno de RSV de longitud completa que contenía la delección del gen SH (pA2ΔSH). El plásmido resultante que contenía las delecciones de SH y M2-2 fue denominado pA2ΔSHΔM2-2. La delección de SH y M2-2 en el plásmido pA2ΔSHΔM2-2 fue confirmada mediante mapeo con enzimas de restricción.

La generación del mutante rA2ΔSHΔM2-2 fue llevada a cabo del modo descrito anteriormente (véase la Sección 7). El RSV recombinante que contenía una delección de los genes SH y M2-2 (rA2ΔSHΔM2-2) fue recuperado de células infectadas con MVA que habían sido cotransfectadas con pA2ΔSHΔM2-2 junto con tres plásmidos que expresaban las proteínas N, P y L, respectivamente. La recuperación del RSV mutante infeccioso por delección venía indicada por la formación sincitial y fue confirmada por inmunotinción con un anticuerpo contra RSV.

La delección de los genes SH y M2-2 en rA2ΔSHΔM2-2 fue confirmada por RT/PCR utilizando dos conjuntos de cebadores que flanqueaban el gen SH y el gen M2-2, respectivamente. La expresión de mRNA de las células infectadas con rA2ΔSHΔM2-2 o rA2 fue analizada mediante análisis de hibridación por transferencia Northern, como se describió anteriormente. No se detectaron mRNAs de SH ni de M2-2 en las células infectadas con rA2ΔSHΔM2-2 al usar una sonda que era específica para el gen SH o el gen M2-2. El hecho de que se puedan suprimir dos genes de RSV (SH y M2-2) indica que las proteínas SH y M2-2 son innecesarias para la replicación del RSV. Por contraste con rA2ΔM2-2, que formaba placas muy pequeñas en células HEp-2, rA2ΔSHΔM2-2 producía placas con un tamaño mayor que el de rA2ΔM2-2 (Figura 19).

Se llevó a cabo en células Vero un estudio sobre la cinética de desarrollo de rA2ΔSHΔM2-2 en comparación con la de rA2. Células cultivadas en placas de 6 cm fueron infectadas con rA2 o rA2ΔSHΔM2-2, con una *moi* de 0,2. Como se ve en la Figura 22, rA2ΔSHΔM2-2 mostraba una cinética de desarrollo más lenta y su título máximo era aproximadamente 1,5 log menor que el de rA2. Esto indicaba que rA2ΔSHΔM2-2 estaba atenuado en el cultivo tisular.

Para evaluar el nivel de atenuación de rA2ΔSHΔM2-2, se examinó la replicación de rA2ΔSHΔM2-2 en los tractos respiratorios inferiores de ratones. Se inocularon intranasalmente 10^6 pfu de rA2ΔSHΔM2-2 o rA2 a ratones en grupos de 6. Se sacrificaron los animales 4 días después de la inoculación, se recogieron y homogeneizaron sus cornetes nasales y tejidos pulmonares, y se determinaron los niveles de replicación viral en esos tejidos mediante un ensayo de placas. rA2ΔSHΔM2-2 presentaba una reducción de la replicación de aproximadamente 2 log en los pulmones de los ratones infectados (Tabla 11). Estos datos indicaban que rA2ΔSHΔM2-2 estaba atenuado en los ratones, aunque el grado de atenuación no es tan significativo como el de rA2ΔM2-2.

TABLA 11

Replicación de rA2ΔSHΔM2-2 y rA2 en ratones

Virus	Título del virus en el pulmón ($\log_{10}$ pfu medio/g de tejido $\pm$ SE) ^a
rA2	4,2 $\pm$ 0,08
rA2ΔSHΔM2-2	2,4 $\pm$ 1,2

^aEl día 0 se inmunizaron intranasalmente grupos de seis ratones con 10^6 pfu del virus indicado. El día 4 se determinó el nivel de replicación del virus de infección mediante un ensayo de formación de placas sobre las muestras indicadas y se determinó el $\log_{10}$ medio del título $\pm$ error estándar (SE) por gramo de tejido.

11.6. Generación de un candidato a vacuna de virus respiratorio sincitial (RSV) humano por delección de los genes M2-2 y NS1 virales

En este ejemplo se describe la producción de un RSV recombinante en el que se ha suprimido la expresión de dos genes de RSV diferentes, NS1 y M2-2, por eliminación de secuencias polinucleotídicas que codifican los genes NS1 y M2-2 y sus proteínas codificadas. Como se describió previamente, el gen NS1 o M2-2 solo es innecesario para la replicación de RSV *in vitro*. Este ejemplo proporcionó un método de atenuación diferente por delección de dos genes accesorios de RSV.

Se suprimieron los genes NS1 y M2-2 de la construcción de cDNA de RSV de longitud completa, por medio de clonación de cDNA. Un fragmento Xma I a Avr II que contenía la delección de NS1 en el subclon pET(X/A) fue separado por digestión con las enzimas de restricción Xma I y Avr II y fue clonado en el clon de cDNA antígeno de RSV de longitud completa que contenía la delección del gen M2-2 (pA2ΔM2-2). El plásmido resultante que contenía tanto la delección de NS1 como la de M2-2 fue denominado pA2ΔNS1ΔM2-2. La delección de NS1 y M2-2 en el plásmido pA2ΔNS1ΔM2-2 fue confirmada mediante mapeo con enzimas de restricción.

ES 2 291 370 T3

La generación del mutante rA2ΔNS1ΔM2-2 fue llevada a cabo del modo descrito anteriormente (véase la Sección 11.2). El RSV recombinante que contenía la delección de los genes NS1 y M2-2 fue recuperado de células infectadas con MVA que habían sido cotransfectadas con pA2ΔNS1ΔM2-2 junto con tres plásmidos que expresaban las proteínas N, P y L, respectivamente. La recuperación del RSV infeccioso venía indicada por la formación sincitial y se confirmó por inmunotinción con un anticuerpo contra RSV. La identificación del rA2ΔNS1ΔM2-2 recuperado se confirmó por RT/PCR usando una pareja de cebadores que flanqueaban el gen NS1 y el gen M2-2.

Se está estudiando la replicación de rA2ΔNS1ΔM2-2 en líneas celulares en cultivo tisular y en modelos con animales pequeños. Datos *in vitro* preliminares indicaban que rA2ΔNS1ΔM2-2 está muy atenuado en células en cultivo tisular y que el RSV recombinante que contiene la delección de los genes NS1 y M2-2 está más atenuado que rA2ΔSHΔM2-2.

11.7. Generación de un candidato a vacuna de virus respiratorio sincitial (RSV) humano por delección de los genes NS2 y M2-2 virales

En este ejemplo se describe la producción de un RSV recombinante en el que se ha suprimido la expresión de dos genes de RSV diferentes, NS2 y M2-2, por eliminación de secuencias polinucleotídicas que codifican los genes NS2 y M2-2 y sus proteínas codificadas. Como se describió previamente, el gen NS2 o M2-2 es innecesario para la replicación de RSV *in vitro*. Es posible que la delección de dos genes accesorios de RSV produzca un RSV recombinante con un diferente fenotipo de atenuación.

Se suprimieron los genes NS2 y M2-2 de la construcción de cDNA de RSV de longitud completa, por medio de clonación de cDNA. Un fragmento Xma I a Avr II que contenía la delección de NS2 en el subclon pET(X/A) fue separado por digestión con las enzimas de restricción Xma I y Avr II y fue clonado en el clon de cDNA antígenómico de RSV de longitud completa que contenía la delección del gen M2-2 (pA2ΔM2-2). El plásmido resultante que contenía tanto la delección de NS2 como la de M2-2 fue denominado pA2ΔNS2ΔM2-2. La delección de NS2 y M2-2 en el plásmido pA2ΔNS2ΔM2-2 fue confirmada mediante mapeo con enzimas de restricción.

La generación del mutante rA2ΔNS2ΔM2-2 fue llevada a cabo del modo anteriormente descrito (véase la Sección 7). El RSV recombinante que contenía la delección de los genes NS2 y M2-2 (rA2ΔNS2ΔM2-2) fue recuperado de células infectadas con MVA que habían sido cotransfectadas con pA2ΔNS2ΔM2-2 junto con tres plásmidos que expresaban las proteínas N, P y L, respectivamente. La recuperación del RSV infeccioso venía indicada por la formación sincitial y fue confirmada por inmunotinción con un anticuerpo contra RSV. La identificación del rA2ΔNS2ΔM2-2 recuperado fue confirmada por RT/PCR utilizando dos parejas de cebadores que flanqueaban el gen NS2 y el gen M2-2, respectivamente.

La expresión de mRNA de células infectadas con rA2ΔNS2ΔM2-2 o rA2 fue analizada mediante análisis de hibridación por transferencia Northern. Como se muestra en la Figura 23, no se detectó mRNA de NS2 ni de M2-2 en las células infectadas con rA2ΔNS2ΔM2-2 al usar una sonda que era específica para el gen NS2 o el gen M2-2. Se observaron niveles comparables de expresión de mRNA de NS1 y SH en las células infectadas con rA2ΔNS2ΔM2-2. Datos de transferencias Northern confirmaron que la expresión de NS2 y M2-2 estaba suprimida en rA2ΔNS2ΔM2-2.

Se llevó a cabo en células Vero un estudio sobre la cinética de desarrollo de rA2ΔNS2ΔM2-2 en comparación con la de rA2. Células cultivadas en placas de 6 cm fueron infectadas con rA2 o rA2ΔNS2ΔM2-2, con una *moi* de 0,2. Como se ve en la Figura 24, rA2ΔNS2ΔM2-2 mostraba una cinética de desarrollo muy lenta y su título máximo era aproximadamente 10 veces menor que el de rA2. Para analizar la replicación vírica en diferentes células huésped, cada línea celular desarrollada en placas de 6 pocillos fue infectada con rA2ΔNS2ΔM2-2 o rA2, con una *moi* de 0,2. Tres días después de la infección, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se cuantificó el virus mediante un ensayo de formación de placas. El título vírico de rA2ΔNS2ΔM2-2 en células Vero presentaba una reducción de aproximadamente unas pocas veces en comparación con el de rA2. Sin embargo, en células HEp-2, MDBK, Hela, MRC-5 y LLC-MK2 (Tabla 12), se observó una reducción del título vírico de 2-3 log. Por lo tanto, la replicación de rA2ΔNS2ΔM2-2 presenta un sustancial efecto específico de huésped, lo que es una indicación de atenuación.

TABLA 12

Comparación del desarrollo de rA2ΔNS2/M2-2 y rA2 en diferentes líneas celulares

Líneas celulares	Título del virus [$\log_{10}$ (pfu/ml)]	
	rA2	rA2ΔNS2/M2-2
Vero	6,4	5,7
HEp-2	6,7	3,5
MDBK	6,7	3,7
MRC-5	5,9	2,0
Hela	6,5	2,9
LLC-MK2	6,7	4,8

Se determinó la replicación *in vivo* de rA2ΔNS2/M2-2 en ratas de milpa de 4 semanas de edad y exentas de patógenos respiratorios. Se inocularon intranasalmente 10^5 pfu de rA2 o rA2ΔNS2ΔM2-2 por animal, en un inóculo de 0,1 ml, a las ratas de milpa en grupos de 5, bajo anestesia suave por metoxiflurano. El día 4 después de la inoculación, se sacrificaron los animales mediante asfixia por CO_2 y se obtuvieron separadamente sus cornetes nasales y sus pulmones. Se homogeneizaron los tejidos y se determinaron los títulos virales mediante un ensayo de formación de placas en células Vero. Como se muestra en la Tabla 13, no se detectó replicación vírica en los tractos respiratorios superior ni inferior de las ratas de milpa que habían sido infectadas con rA2ΔNS2ΔM2-2. Esto indicaba que la delección de los genes NS2 y M2-2 atenuaba intensamente el RSV. De esta manera, este RSV recombinante con una delección de NS2 y M2-2 podría servir como un buen candidato a vacuna para uso humano.

TABLA 13

Replicación de rA2ΔNS2/M2-2 y rA2 en ratas de milpa

Virus	Título vírico ($\log_{10}$ pfu medio/g de tejido $\pm$ SE) ^a	
	Cornetes nasales	Pulmón
rA2	2,30 $\pm$ 0,26	4,23 $\pm$ 0,10
rA2ΔNS2/M2-2	< 1,4	< 1,4

^aEl día 0 se inmunizaron intranasalmente grupos de cinco ratas de milpa con 10^5 pfu del virus indicado. El día 4 se determinó el nivel de replicación del virus de infección mediante un ensayo de formación de placas sobre las muestras indicadas y se determinó el $\log_{10}$ medio del título $\pm$ error estándar (SE) por gramo de tejido.

Como se resume en la Tabla 17, se han obtenido 11 diferentes mutantes por delección génica (no todos de acuerdo con el invento). Se han suprimido cuatro genes accesorios de RSV, individualmente o en combinación. Estos diferentes mutantes por delección mostraron una diferente formación de placas y diferentes propiedades de desarrollo. Se demostró una buena correlación entre el tamaño de las placas *in vitro* y la atenuación *in vivo*. Estos diferentes mutantes de RSV por delección proporcionan diversas opciones para uso como posibles candidatos a vacuna de RSV.

TABLA 17

Resumen de mutantes de RSV por delección génica

	<u>Virus</u>	<u>Recuperado</u>
5	$\Delta M2-2$	Sí
	ΔSH	Sí
10	$\Delta NS1$	Sí
	$\Delta NS2$	Sí
15	$\Delta M2-2\Delta SH$	Sí
	$\Delta M2-2\Delta NS1$	ND ^a
	$\Delta M2-2\Delta NS2$	Sí
20	$\Delta NS1\Delta NS2$	Sí
	$\Delta SH\Delta NS1$	Sí
	$\Delta SH\Delta NS2$	Sí
25	$\Delta SH\Delta NS1\Delta NS2$	Sí

^a ND: no determinado. No se detectó replicación de rA2 $\Delta M2-2\Delta NS1$ en cultivo tisular.

30 13. Ejemplo

El virus respiratorio sincitial (RSV) quimérico del subgrupo A con las glicoproteínas del subgrupo B y el RSV sin el gen M2-2 están atenuados en monos verdes africanos

35 13.1. Introducción

En este estudio, se evaluó rA2 $\Delta M2-2$ en cuanto a su atenuación, inmunogenicidad y eficacia protectora frente a una posterior estimulación con RSV de tipo silvestre en monos verdes africanos (AGM; del inglés, *african green monkeys*). La replicación de rA2 $\Delta M2-2$ estaba restringida más de 1000 veces en los tractos respiratorios superior e inferior de los monos infectados y rA2 $\Delta M2-2$ inducía unos títulos de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV que eran ligeramente menores que los inducidos por rA2 de tipo silvestre. Cuando los monos infectados con rA2 $\Delta M2-2$ eran estimulados con el virus A2 de tipo silvestre, la replicación del virus de estimulación se reducía aproximadamente 100 veces en el tracto respiratorio superior y 45.000 veces en el tracto respiratorio inferior. Para atenuar más rA-G_BF_B, se eliminó el marco de lectura abierto M2-2 de rA-G_BF_B. Como se describió para rA2 $\Delta M2-2$, rA-G_BF_B $\Delta M2-2$ resultó restringido en cuanto al desarrollo en células HEp-2 y resultó atenuado en ratas de milpa. rA2 y rA-G_BF_B que llevan una delección del gen M2-2 podrían representar una composición de vacuna de RSV bivalente para protección frente a múltiples cepas de los dos subgrupos de RSV.

Se evaluaron monos verdes africanos como un modelo de primate no humano para valorar la atenuación, la inmunogenicidad y la eficacia protectora de los candidatos a vacuna de RSV. Se mostró que rA2 se replicaba con títulos elevados en los tractos respiratorios superior e inferior de AGM mientras que rA2 $\Delta M2-2$ y rA-G_BF_B se replicaban mal en los tractos respiratorios de los monos. Tanto rA2 $\Delta M2-2$ como rA-G_BF_B inducían anticuerpos neutralizantes que protegían a los animales de la estimulación experimental

55 13.2. Materiales y métodos

Células y virus

Se mantuvieron cultivos de monocapas de células HEp-2 y Vero (obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en medio esencial mínimo (MEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 5%. Las cepas de RSV de tipo silvestre, A2 y B9320 fueron obtenidas de la ATCC y fueron cultivadas en células Vero. El virus vaccinia Ankara modificado (MVA-T7) que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7 fue cultivado en células CEK.

Construcción del clon de cDNA quimérico

Se cultivó RSV B9320 de tipo silvestre en células Vero y se extrajo el RNA vírico del sobrenadante del cultivo de células infectadas. Se obtuvo por RT/PCR un fragmento de cDNA que contenía los genes G y F de RSV B9320,

utilizando los cebadores siguientes: *ATCAGGATCCACAATAACATTGGGGCAAATGCAACC* y *CTGGCATTTCGGATCCGTTTTATGTAAGTATGAGTTG* (los sitios BamH I construidos para clonación están en letra cursiva y las secuencias específicas de B9320 están subrayadas). Los sitios de la enzima de restricción BamH I se introdujeron cadena arriba de la secuencia de inicio génico de G y cadena abajo de la secuencia de fin génico de F. Se introdujo primero el producto de PCR en el vector de clonación T/A (Invitrogen) y se confirmaron las secuencias por secuenciación de DNA. El fragmento de restricción BamH I que contenía el casete de los genes G y F de B9320 fue luego transferido a un subclon pRSV(R/H) de cDNA de RSV que contenía secuencias de RSV del nt 4326 al nt 9721, a través de los sitios Bgl II introducidos en el nt 4655 (cadena arriba de la señal de inicio génico de G) y el nt 7552 (cadena abajo de la señal de fin génico de F). La introducción de estos dos sitios Bgl II fue realizada mediante mutagénesis por PCR usando el sistema QuickChange para mutagénesis (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). Los sitios de las enzimas de restricción BamH I y Bgl II tienen extremos compatibles, pero la ligación elimina ambos sitios de restricción. El fragmento de restricción Xho I (nt 4477) a BamH I (nt 8498) que contiene los genes G y F de B9320 fue luego trasladado al clon pRSVC4G infeccioso de cDNA antigenómico de RSV (Jin *et al.*, 1998). El cDNA antigenómico quimérico fue denominado pRSV-G_BF_B. Para suprimir el gen M2-2 de pRSV-G_BF_B, se introdujo en pRSV-G_BF_B el fragmento Msc I (nt 7692) a BamH I (nt 8498) de rA2ΔM2-2 que contenía la delección de M2-2 (Jin *et al.*, 2000a). El clon de cDNA quimérico que carece del gen M2-2 fue denominado pRSV-G_BF_BΔM2-2.

Recuperación del RSV recombinante

Se describe aquí la recuperación de RSV recombinante a partir de cDNA. En resumen, células HEp-2 en placas de 6 pocillos, con 80% de confluencia, fueron infectadas con MVA durante 1 hora con una moi de 5 pfu/célula y fueron luego transfectadas con plásmidos antigenómicos de longitud completa (pRSV-G_BF_B o pRSV-G_BF_BΔM2-2) junto con plásmidos que expresan las proteínas N, P y L de RSV, usando el reactivo LipofectACE (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Una vez que las células transfectadas hubieron sido incubadas a 35°C durante tres días, los sobrenadantes de los cultivos fueron sometidos a pases en células Vero durante seis días para multiplicar el virus rescatado. Los virus recombinantes recuperados fueron biológicamente clonados mediante tres purificaciones sucesivas por formación de placas y fueron adicionalmente multiplicados en células Vero. El virus recuperado de las células transfectadas con pRSV-G_BF_B se denominó rA-G_BF_B y el recuperado de las células transfectadas con pRSV-G_BF_BΔM2-2 se denominó rA-G_BF_BΔM2-2. Se determinó el título vírico mediante un ensayo de formación de placas y se visualizaron las placas mediante inmunotinción usando un suero policlonal anti-RSV A2 (Biogenesis, Sandown, New Hampshire, EE.UU.).

Caracterización del virus

La expresión del RNA vírico de cada RSV quimérico recuperado fue analizada por transferencia Northern. 48 horas después de la infección, el RNA celular total fue extraído de las células infectadas con virus. La transferencia de RNA fue hibridada con una sonda oligonucleotídica marcada con γ -³²P-ATP y específica para el gen F de B9320 (GAGGTGAGGTACAATGCATTAATAGCAAGATGGAGGAAGA) o con una sonda marcada con γ -³²P-ATP y específica para el gen F de A2 (CAGAAGC-AAAACAAAATGTGACTGCAGTGAGGATTGTGGT). Para detectar el mRNA de G de los virus quiméricos, las transferencias de RNA fueron hibridadas con una ribosonda de 190 nt específica para el gen G de B9320 o con una ribosonda de 130 nt específica para el gen G de A2. Ambas ribosondas fueron marcadas con α -³²P-CTP. La hibridación se llevó a cabo a 65°C en una disolución Express Hyb (Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.) durante la noche. Se lavaron las membranas a 65°C bajo condiciones rigurosas y se expuso una película a ellas.

Las proteínas específicas virales de las células infectadas se analizaron por inmunoprecipitación de los extractos de células infectadas o por transferencia Western. Para inmunoprecipitar las proteínas víricas, se infectaron células Vero con el virus, con una moi de 1,0, y se marcaron con ³⁵S-Promix (3700 kBq/ml de ³⁵S-Cys y ³⁵S-Met; Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.) 14 horas a 18 horas después de la infección. Las monocapas de células marcadas fueron lisadas con tampón RIPA, y los polipéptidos fueron inmunoprecipitados mediante suero policlonal de cabra anti-RSV A2 (Biogenesis, Sandown, New Hampshire, EE.UU.) o mediante un anticuerpo policlonal contra la proteína M2-2. Los polipéptidos inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; del inglés, polyacrylamide gel electrophoresis) con SDS y fueron detectados por autorradiografía. Para el análisis por transferencia Western, las células Vero infectadas con virus fueron lisadas en tampón de lisis para proteínas, y las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12%. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nailon y se llevó a cabo la inmunotransferencia del modo aquí descrito usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína G de B9320 o un anticuerpo monoclonal contra la proteína G de A2 (Storch y Park, 1987, J. Med. Virol. 22: 345-356).

El desarrollo de RSV quimérico *in vitro* fue comparado con el de A2 recombinante (rA2) de tipo silvestre y rA2ΔM2-2. El análisis de los ciclos de desarrollo fue llevado a cabo sobre células HEp-2 y Vero. Células cultivadas en placas de 6 cm fueron infectadas con cada virus, con una moi de 0,01 ó 0,1. Después de 1 hora de adsorción a temperatura ambiental, las monocapas de células infectadas fueron lavadas tres veces con PBS y fueron incubadas a 35°C con 4 ml de Opti-MEM en una incubadora que contenía CO₂ al 5%. En diversos momentos después de la infección, se recogieron 200 μ l del sobrenadante del cultivo y se guardaron a -70°C para la titulación del virus. Cada parte alícuota extraída fue sustituida por una cantidad igual de medio fresco. El título del virus fue determinado mediante un ensayo de formación de placas sobre células Vero, en placas de 12 pocillos, usando una capa de metilcelulosa al 1% y medio L15 1x que contenía FBS al 2%.

Replicación del virus en ratas de milpa

La replicación del virus *in vivo* fue determinada en ratas de milpa *S. hispidus*, exentas de patógenos respiratorios. Se inocularon intranasalmente $10^{5.5}$ pfu de virus por animal, en un inóculo de 0,1 ml, a ratas de milpa en grupos de 12 bajo anestesia suave por metoxiflurano. El día 4 después de la inoculación, se sacrificaron seis animales mediante asfixia por CO_2 y se recogieron separadamente sus cornetes nasales y sus pulmones. Se homogeneizaron los tejidos y se determinaron los títulos virales mediante un ensayo de formación de placas en células Vero. Tres semanas más tarde, se anestesiaron los 6 animales restantes, se recogieron muestras de suero y se realizó una inoculación intranasal de estimulación, de 10^6 pfu de cepa A2 o B9320 de RSV de tipo silvestre biológicamente obtenida. Cuatro días después de la estimulación, se sacrificaron los animales, se recogieron y homogeneizaron tanto los cornetes nasales como los pulmones, y se determinó el título del virus mediante un ensayo de formación de placas. Se determinaron los anticuerpos neutralizantes séricos contra la cepa A2 o B9320 de RSV mediante un ensayo de reducción de placas del 50% [Coates *et al.*, 1966, Am. J. Epidemiol. 83 (2): 299-313]

Replicación del virus en AGM

Se evaluó el RSV recombinante en cuanto a su replicación, inmunogenicidad y eficacia protectora en AGM (*Cercopithecus aethiops*). En el primer estudio (estudio A), se utilizaron AGMs obtenidos de St. Kitts, con una edad media de 4,2 años y un peso corporal que variaba de 2,2 a 4,3 kg, para comparar la replicación de rA2 con la de A2 de tipo silvestre. En el segundo estudio (estudio B), se usaron AGMs con edades que variaban de 5,3 a 8,4 años y un peso corporal medio de 4,15 kg. Ninguno de los monos presentaba anticuerpos neutralizantes séricos detectables para RSV B9320 ni RSV A2 (título $< 1:10$). Se inoculó tanto intranasal como intratraquealmente una dosis de $10^{5.5}$ pfu de A2 de tipo silvestre, rA2, rA2ΔM2-2, B9320 de tipo silvestre o rA-G_BF_B a grupos de 4 monos, usando un inóculo de 1,0 ml en cada sitio. Después de la inoculación, se tomaron diariamente muestras nasofaríngeas (NP; del inglés, nasopharyngeal) de cada mono con una torunda durante 12 días, bajo anestesia por Telazol, y se recogieron lavados traqueales (BAL) los días 3, 5, 7 y 10 después de la infección (Kakuk *et al.*, 1993, J. Infect. Dis. 167 (3): 553-561). El día 28 después de la infección, se recogieron muestras de suero de cada mono infectado y se estimularon los monos con una dosis de $10^{5.5}$ pfu de A2 o B9320 de tipo silvestre, en un inóculo de 1,0 ml, en los sitios intranasal e intratraqueal. La replicación del virus de estimulación en los tractos respiratorios superior e inferior de los monos fue examinada por cuantificación del virus descargado en las muestras NP y de lavado traqueal. Las muestras NP fueron recogidas diariamente durante 10 días y las muestras de BAL fueron recogidas los días 3, 5, 7 y 10 después de la estimulación. Catorce días después de la estimulación con el virus de tipo silvestre, se recogieron muestras de suero para la medición de anticuerpos neutralizantes de RSV mediante el ensayo de reducción de placas del 50%, usando virus A2 o B9320 de tipo silvestre. El virus descargado en las muestras NP y de BAL fue cuantificado mediante un ensayo de formación de placas utilizando células Vero.

13.3. Resultados

Construcción de cDNA y recuperación de un virus quimérico RSV A/B

Se construyeron previamente un cDNA antigenómico infeccioso que codificaba la cepa A2 de RSV wt, y su derivado que contenía la delección del gen M2-2. Estos cDNAs fueron aquí modificados mediante la sustitución de los genes G y F de la cepa A2 por aquellos de B9320, para producir virus quiméricos que expresaban antígenos del subgrupo B de RSV. Las secuencias de inicio génico y fin génico están muy conservadas entre los dos subgrupos del RSV. Por lo tanto, los genes G y F completos de B9320 que incluían sus propias señales de inicio génico y fin génico fueron transferidos a la cadena principal del cDNA de A2 (Figura 26). El cDNA que codificaba los genes G y F de B9320 fue obtenido mediante RT/PCR y fue confirmado mediante el análisis de su secuencia. El cDNA quimérico construido fue denominado pRSVA-G_BF_B. Se construyó pRSVA-G_BF_BΔM2-2 por supresión del gen M2-2 de pRSVA-G_BF_B. El gen M2 que contenía la delección del marco de lectura abierto M2-2 de rA2ΔM2-2 fue introducido en pRSVA-G_BF_B a través de los sitios únicos de las enzimas de restricción Msc I y BamH I. Ambos virus quiméricos (rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2) fueron recuperados del cDNA utilizando el sistema de rescate previamente descrito. Los virus recombinantes recuperados fueron purificados por formación de placas y fueron multiplicados en células Vero.

Caracterización de los virus quiméricos recombinantes in vitro

La expresión de las proteínas específicas de subgrupo por los virus quiméricos fue analizada por transferencias Northern y Western. Utilizando sondas específicas para la cepa, se detectaron mRNAs de G y F específicos de B9320 en las células infectadas con rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 (Figura 27A). No se detectó el gen M2-2 en las células infectadas con rA-G_BF_BΔM2-2, lo que confirma que se había suprimido el gen M2-2 de este virus quimérico. También se comparó la expresión de proteínas específicas de la cepa B9320 por los dos virus quiméricos con aquella realizada por rA2, rA2ΔM2-2 y B9320 de tipo silvestre (Figura 27B). La proteína F1 de rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 mostró el mismo índice de movilidad de migración que la de B9320, migrando ambas más rápidamente que la de A2. Un análisis por transferencia Western usando anticuerpos monoclonales específicos de cepa confirmó que rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 expresaban la proteína G del subgrupo B (Figura 27B). Una transferencia Western usando un anticuerpo policlonal específico para la proteína M2-2 confirmó adicionalmente la supresión del gen M2-2 en rA2ΔM2-2 y rA-G_BF_BΔM2-2.

Se comparó la replicación de los virus quiméricos rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 con la de rA2 y rA2ΔM2-2, tanto en células HEp-2 como Vero (Figura 28). En las células Vero, infectadas con una moi de 0,1, tanto rA-G_BF_B como rA-G_BF_BΔM2-2 alcanzaron títulos máximos similares a los vistos con rA2 de tipo silvestre y rA2ΔM2-2, respectivamente. Con una moi inferior, de 0,01, el título máximo de rA-G_BF_B estaba ligeramente reducido en comparación con el de rA2, y el nivel de replicación de rA-G_BF_BΔM2-2 estaba reducido aproximadamente 10 veces en comparación con el de rA-G_BF_B. En células HEp-2, con una moi de 0,1, rA-G_BF_B mostraba un título máximo ligeramente menor que el de rA2 wt, mientras que la replicación de rA-G_BF_BΔM2-2 estaba reducida aproximadamente 100 veces. Con una moi de 0,01, el título máximo de rA-G_BF_B estaba reducido aproximadamente 10 veces en comparación con el de rA2, y el título máximo de rA-G_BF_BΔM2-2 estaba reducido 100 veces. Por lo tanto, similarmente a lo observado para rA2ΔM2-2, rA-G_BF_BΔM2-2 también presentaba una replicación restringida en células HEp-2, mientras que su replicación en células Vero resultó menos dañada.

Replicación de RSV quimérico en ratas de milpa

Las ratas de milpa son sensibles a la infección por RSV de los subgrupos A y B. Los niveles de replicación de rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 en los cornetes nasales y los pulmones de ratas de milpa fueron comparados con los de rA2, rA2ΔM2-2 y B9320 de tipo silvestre (Tabla 21). La replicación de rA-G_BF_B en los cornetes nasales estaba por debajo del límite de detección del ensayo de formación de placas; su replicación en tejido pulmonar estaba reducida en aproximadamente 3,6 log₁₀ en comparación con la de B9320 de tipo silvestre y en aproximadamente 2,0 log₁₀ con respecto a la de rA2. La replicación de rA2ΔM2-2 no fue detectada en los cornetes nasales y fue 1,6 log menor que la de rA2 en el pulmón. La eliminación de M2-2 de rA-G_BF_B atenuó más el virus quimérico. No se detectó replicación vírica en los cornetes nasales ni en los pulmones de las ratas de milpa infectadas con rA-G_BF_BΔM2-2.

Aunque rA-G_BF_B y rA-G_BF_BΔM2-2 estaban atenuados en ratas de milpa, ambos virus quiméricos inducían suficiente inmunidad contra RSV para proteger a los animales de la estimulación (Tabla 21). El nivel de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV inducido por rA-G_BF_B era 2,85 veces menor que el inducido por B9320 de tipo silvestre. El anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV inducido por rA-G_BF_BΔM2-2 era aproximadamente 4 veces menor que el inducido por B9320 y 1,5 veces menor que el de rA-G_BF_B. Por comparación, el nivel de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV inducido por rA2ΔM2-2 estaba similarmente reducido, aproximadamente 2 veces, en comparación con el de rA2.

Replicación de RSV wt y rA2ΔM2-2 en AGM

Con objeto de investigar la atenuación y la inmunogenicidad de RSV en primates, se estudió adicionalmente la replicación de RSV recombinante en AGM. En el Estudio A se examinó la replicación de los virus A2 recombinante y A2 de tipo silvestre en los tractos respiratorios de AGM. Se infectaron intranasal e intratraquealmente AGM seronegativos para RSV con 10^{5.5} pfu de rA2 o A2 wt y se controló la descarga vírica en los tractos respiratorios superior e inferior a lo largo de un periodo de 12 días. Como se muestra en la Tabla 22, rA2 se replicaba bien en los tractos respiratorios superior e inferior de AGM. rA2 alcanzó un título máximo de 4,18 y 4,28 log₁₀ pfu/ml en cada sitio, respectivamente, y descargó virus a lo largo del mismo periodo de tiempo que el virus A2 de tipo silvestre (Tabla 22, Estudio A), aunque el título máximo de rA2 en los tractos respiratorios de AGM era ligeramente menor que el obtenido con el virus A2 de tipo silvestre. Una vez confirmado el alto nivel de replicación de rA2 en AGM, se evaluó rA2ΔM2-2 en cuanto a su atenuación, inmunogenicidad y eficacia protectora en AGM. En un estudio independiente (Estudio B, Tabla 22), rA2ΔM2-2 mostró un nivel de replicación muy reducido, tanto en la nasofaringe como en la tráquea, en comparación con rA2. Su título máximo en la nasofaringe presentaba una reducción de 3,1 log₁₀, mientras que el título máximo en la tráquea estaba reducido por 3,25 log₁₀. A pesar del nivel mucho menor de replicación en los tractos respiratorios, rA2ΔM2-2 inducía un nivel significativo de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV. A las tres semanas después de la infección, el título de anticuerpos inducido por rA2ΔM2-2 era aproximadamente 4 veces menor que el inducido por rA2 (Tabla 23). Cuando se estimuló con virus A2 de tipo silvestre, rA2ΔM2-2 proporcionó una protección parcial frente a la replicación de RSV de tipo silvestre en el tracto respiratorio superior y una protección casi completa en el tracto respiratorio inferior de los monos inmunizados. Los tractos respiratorios superior e inferior de los monos a los que se había inoculado rA2 estaban totalmente protegidos (Tabla 23). Aunque rA2ΔM2-2 no proporcionaba una protección completa en los tractos respiratorios de los monos inmunizados, presentaba una reducción de 5 días en la descarga vírica. Dos semanas después de la estimulación, el nivel de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV de los monos infectados con rA2ΔM2-2 alcanzó el nivel inducido por rA2.

Replicación de rA-G_BF_B quimérico y B9320 de tipo silvestre en AGM

Se comparó el nivel de replicación de rA-G_BF_B quimérico con el de B9320 de tipo silvestre. Se inocularon 10^{5.5} pfu de rA-G_BF_B o B9320 a AGMs seronegativos para RSV mediante instilaciones intranasal e intratraqueal. Las muestras de lavado traqueal y las tomadas de la garganta con una torunda fueron recogidas a lo largo de 12 días para la cuantificación viral. B9320 se replicaba con un nivel similar al del virus A2 de tipo silvestre (Tabla 22). El título máximo de rA-G_BF_B en los tractos respiratorios de los monos infectados estaba aproximadamente 1000 veces reducido en comparación con el de B9320. Los animales infectados con rA-G_BF_B descargaban el virus durante un periodo más corto que los infectados con B9320. A pesar de su replicación significativamente atenuada, rA-G_BF_B proporcionó protección completa cuando se estimuló con B9320 de tipo silvestre. No se detectó virus de estimulación en los tractos respiratorios superior ni inferior de los monos previamente inmunizados con rA-G_BF_B (Tabla 23). Consistentemente con el nivel de protección visto en los monos inmunizados con rA-G_BF_B, el nivel de anticuerpo neutralizante sérico

anti-RSV de estos monos estaba sólo marginalmente reducido (aproximadamente 2 veces) en comparación con el observado en los animales infectados con B9320 de tipo silvestre. El nivel de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV inducido por rA-G_BF_B resultó aumentado por las subsiguientes infecciones con RSV de tipo silvestre.

5 13.4. Discusión

Para acelerar el desarrollo de vacunas para RSV del subgrupo B, se usó un virus A2 recombinante como un vector para expresar antígenos superficiales de RSV del subgrupo B. El virus quimérico debería provocar una respuesta inmune equilibrada y proporcionar protección frente a una infección por RSV del subgrupo B. Como un planteamiento para expresar antígenos del subgrupo B de RSV, se construyó un virus quimérico diferente en que los genes G y F de la cepa A2 estaban completamente sustituidos por los genes G y F de la cepa B9320. El RSV quimérico fue luego adicionalmente atenuado utilizando una estrategia desarrollada para atenuar el virus A2.

El RSV quimérico recuperado (rA-G_BF_B) se replicaba eficazmente en células Vero, pero su desarrollo en células HEP-2 estaba reducido de 5 a 10 veces con respecto al de rA2. El virus rA-G_BF_B estaba atenuado en los tractos respiratorios superior e inferior de las ratas de milpa. Para determinar si la atenuación de rA-G_BF_B era específica del huésped, este virus quimérico fue adicionalmente evaluado en AGMs, que genéticamente están más estrechamente relacionados con los seres humanos que los roedores. La infección por RSV en AGM está menos bien caracterizada y hay una gran variedad en cuanto al título máximo comunicado (Crowe *et al.*, 1996, J. Infect. Dis. 173: 829-839; Kakuk *et al.*, 1993, J. Infect. Dis. 167: 553-561). Por lo tanto, la infección por RSV fue primero analizada en AGM utilizando virus de tipo silvestre. Se mostró que tanto el subgrupo A como el subgrupo B de RSV se replicaban igualmente bien en AGM y que los títulos víricos recuperados de los tractos respiratorios superior e inferior de AGM eran comparables a los observados en chimpancés infectados (Crow *et al.*, 1994, Vaccine 12: 783-790). Cuando se evaluó rA-G_BF_B en AGM, mostró una reducción media del título máximo de 3,0 log₁₀ en el tracto respiratorio superior y una reducción de 2,59 log₁₀ en el tracto respiratorio inferior.

El nivel de atenuación de rA-G_BF_B en AGM era consistente con los niveles observados en ratas de milpa. Sin embargo, este resultado era algo diferente del comunicado para un RSV quimérico recientemente descrito en que los genes G y F de A2 habían sido sustituidos por los de la cepa B1 de RSV (rAB1, Whitehead *et al.*, 1999, J. Virol. 73: 9773-80). Aunque rAB1 y rA-G_BF_B están similarmente atenuados en ratas de milpa, rAB1 no estaba atenuado en chimpancés. Por contraste con rA-G_BF_B, rAB1 se replicaba mejor que RSV B1 wt en los tractos respiratorios superior e inferior de los chimpancés (Whitehead *et al.*, 1999, J. Virol. 73: 9773-80). Parte de esta discrepancia puede ser explicada por la semipermeabilidad de los chimpancés a una infección por RSV del subgrupo B de tipo silvestre. Sin embargo, existe la posibilidad de que rA-G_BF_B esté más atenuado que rAB1 a causa de diferencias en los antígenos superficiales de la cepa del subgrupo B, o de efectos de constelación cuando estos antígenos son introducidos en una cadena principal de A2. Por lo tanto, parece que la quimerización de proteínas heterólogas diferentes estrechamente relacionadas puede dar lugar a fenotipos diferentes. Para varios paramixovirus, se ha comunicado la quimerización de antígenos superficiales que da lugar a un virus atenuado. La replicación *in vitro* de un virus quimérico del sarampión con las proteínas HN y F sustituidas por la proteína G de VSV resultó muy restringida (Spielhofer *et al.*, 1998, J. Virol. 72: 2150-2159). Un virus quimérico de la peste bovina en que las proteínas F y H habían sido sustituidas por las proteínas superficiales heterólogas de un virus de la peste de los pequeños rumiantes estrechamente relacionado resultó atenuado *in vitro*, como indicaban el lento crecimiento viral y la lenta producción viral (Das *et al.*, 2000, J. Virol. 74: 9039-9047). Más recientemente, se ha comunicado que el virus quimérico PIV3-PIV2 en que los genes F y HN de PIV3 habían sido sustituidos por los de PIV2 no resultó atenuado *in vitro* pero resultó intensamente atenuado en hámster, AGM y chimpancé (Tao *et al.*, 2000, J. Virol. 74: 6448-6458). Por otra parte, el virus quimérico PIV3-PIV1 no resultó atenuado *in vivo* (Tao *et al.*, 1998, J. Virol. 72: 2955-2961; Tao *et al.*, 1999, Vaccine 17: 1100-1108). Aunque atenuado en AGM, rA-G_BF_B inducía niveles significativos de anticuerpo neutralizante anti-RSV y proporcionaba una protección completa contra la subsiguiente estimulación con el RSV del subgrupo B de tipo silvestre.

En este estudio, se evaluó rA2ΔM2-2 en cuanto a su atenuación, inmunogenicidad y protección frente a la estimulación por RSV de tipo silvestre en AGM. Se mostró que rA2ΔM2-2 estaba atenuado en los tractos respiratorios de AGM, y, después de la estimulación, se observó una replicación muy reducida del RSV de tipo silvestre en los animales previamente infectados con rA2ΔM2-2. El nivel de replicación y protección observado para rA2ΔM2-2 en AGM es muy similar al comunicado, en un estudio con chimpancés, para un RSV recombinante similar al que se había silenciado la expresión de la proteína M2-2 (Bermingham y Collins, 1999, PNAS USA 96: 11.259-11.264; Teng *et al.*, 2000, J. Virol. 74: 9317-9321). También se pudo demostrar que rA2ΔM2-2 está más atenuado en seres humanos que un candidato a vacuna previamente ensayado, cpts248/404 (Teng *et al.*, 2000, J. Virol. 74: 9317-9321). cpts248/404 no resultó suficientemente atenuado ni genéticamente estable en niños no tratados (Crowe *et al.*, 1994, Vaccine 12: 783-790; Wright *et al.*, 2000, J. Infect. Dis. 182: 1331-1342). El título de anticuerpos neutralizantes séricos anti-RSV inducido por rA2ΔM2-2 fue ligeramente menor que el inducido mediante la infección por RSV de tipo silvestre. Sin embargo, el aumento del título de anticuerpos neutralizantes después de la estimulación sugiere que se podría potenciar la inmunogenicidad de rA2ΔM2-2 mediante administraciones repetidas.

Puesto que rA2ΔM2-2 presenta muchas de las características deseadas para una vacuna viva atenuada, se consideró que la delección del gen M2-2 era una manera apropiada de atenuar más el rA-G_BF_B quimérico. El estudio *in vitro* indicó que rA-G_BF_BΔM2-2 tenía un nivel de atenuación similar al de rA2ΔM2-2, presentando una formación sincitial aumentada, un crecimiento reducido en células HEP-2 y una relación desequilibrada de transcripción a replicación de RNA. Puesto que el virus rA-G_BF_B quimérico ya está atenuado tanto en ratas de milpa como en AGM, se espera

que rA-G_BF_BΔM2-2 esté más atenuado que rA2ΔM2-2. Sin embargo, estudios en ratas de milpa indicaron que rA-G_BF_BΔM2-2 era aún capaz de inducir un nivel de anticuerpo neutralizante sérico anti-RSV que se aproximaba al inducido por rA-G_BF_B y proporcionaba una protección completa frente a la subsiguiente estimulación experimental. Por lo tanto, rA-G_BF_BΔM2-2 puede representar un adecuado candidato a vacuna para proteger frente a una infección por RSV del subgrupo B.

El alcance del presente invento no ha de estar limitado por las realizaciones específicas descritas, que son consideradas como simples ilustraciones de aspectos individuales del invento, y todas las construcciones virus o enzimas que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de este invento. En realidad, diversas modificaciones del invento, además de las aquí mostradas y descritas, se harán evidentes a los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente y los dibujos adjuntos. Se pretende que dichas modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una partícula aislada infecciosa de virus respiratorio sincitial que tiene un fenotipo atenuado que comprende un genoma o antigenoma de virus respiratorio sincitial, en que dicho genoma o antigenoma tiene: (a) una secuencia heteróloga que codifica unas proteínas G y F, de la cepa B9320 de RSV; y (b) una delección del marco de lectura abierto M2-2.
- 10 2. La partícula aislada infecciosa de virus respiratorio sincitial de acuerdo con la Reivindicación 1, en que los genes heterólogos G y F sustituyen a los genes G y F del genoma del virus huésped.
3. La partícula aislada infecciosa de virus respiratorio sincitial de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicha secuencia heteróloga procede de una cepa diferente de virus respiratorio sincitial.
- 15 4. Un DNA aislado que codifica una partícula infecciosa de virus respiratorio sincitial que tiene un fenotipo atenuado que comprende un antigenoma o genoma de virus respiratorio sincitial, en que dicho genoma o antigenoma tiene: (a) una secuencia heteróloga que codifica unas proteínas G y F, de la cepa B9320 de RSV; y (b) una delección del marco de lectura abierto M2-2.
- 20 5. El cDNA aislado que codifica una partícula infecciosa de virus respiratorio sincitial de acuerdo con la Reivindicación 4, en que los genes heterólogos G y F sustituyen a los genes G y F del genoma del virus huésped.
6. Una vacuna que comprende (a) el virus respiratorio sincitial infeccioso aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende (a) el virus respiratorio sincitial infeccioso aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

35

40

45

50

55

60

65

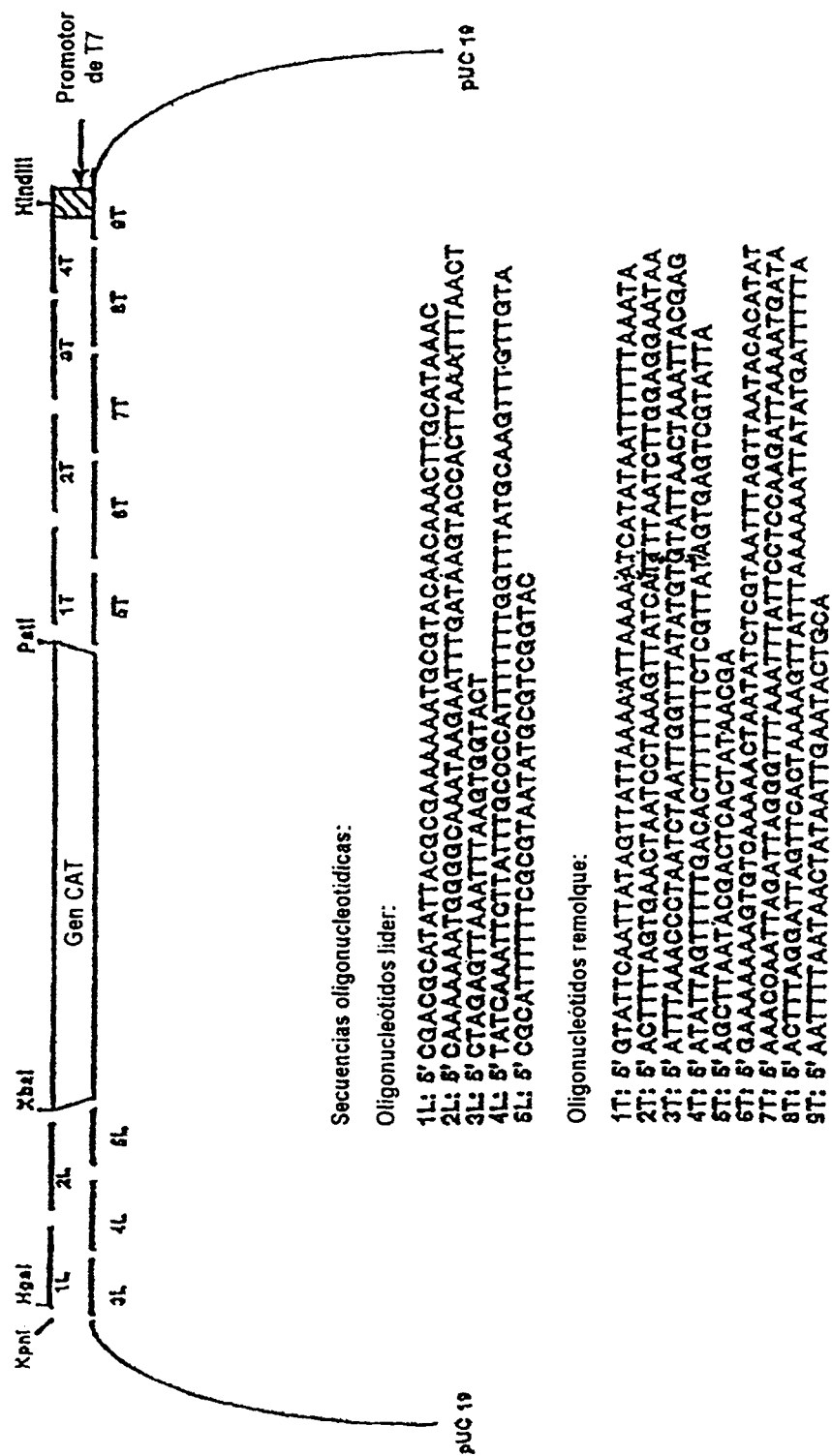


FIG. 1

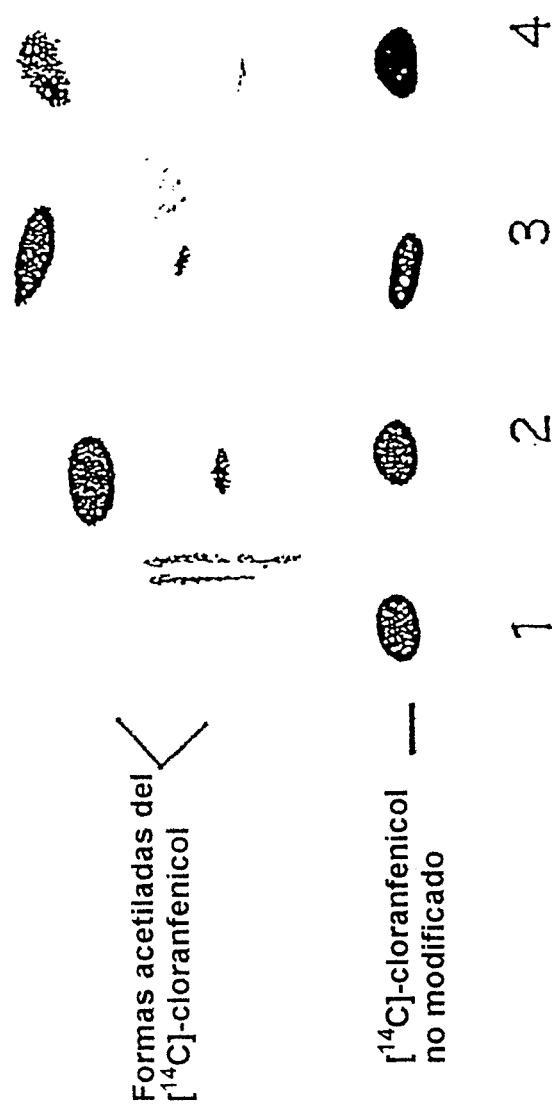


FIG. 2

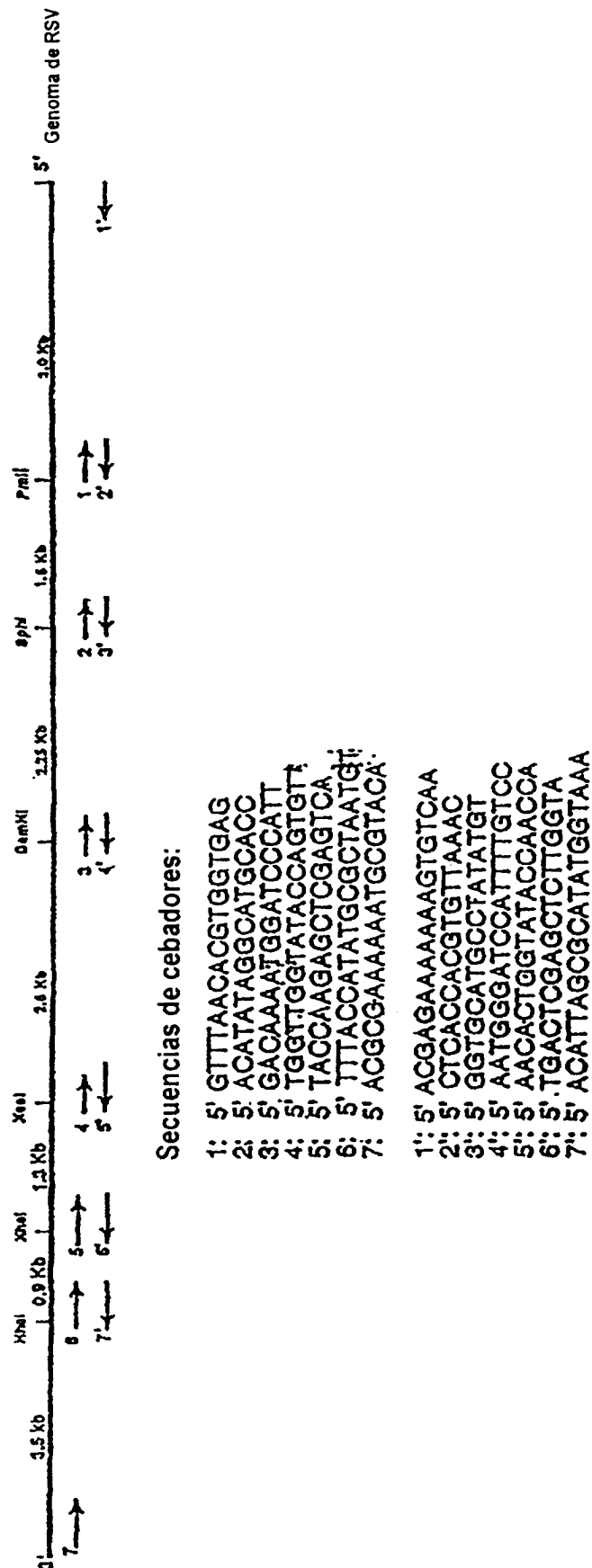
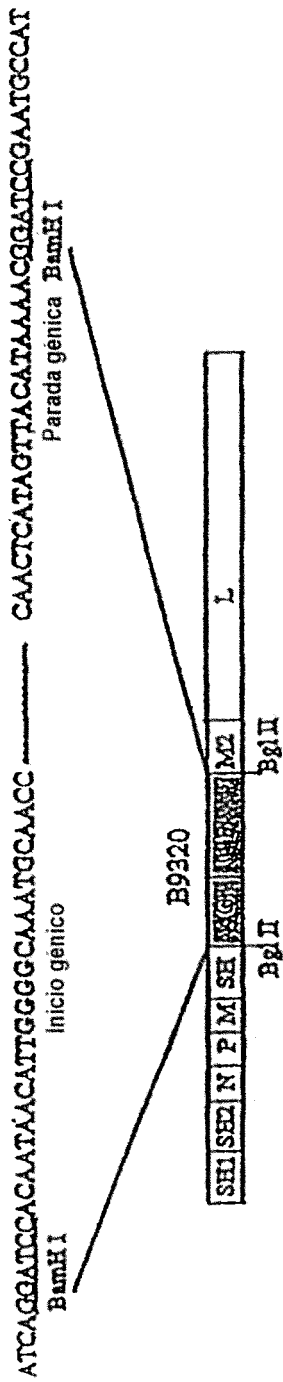


FIG. 3

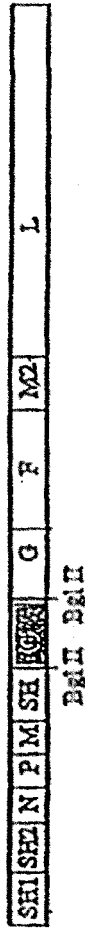
A. RSVB-GF



B. RSVB9320G-F/M2



C. RSVB9320G-SH/G



FIGURAS 4A-C

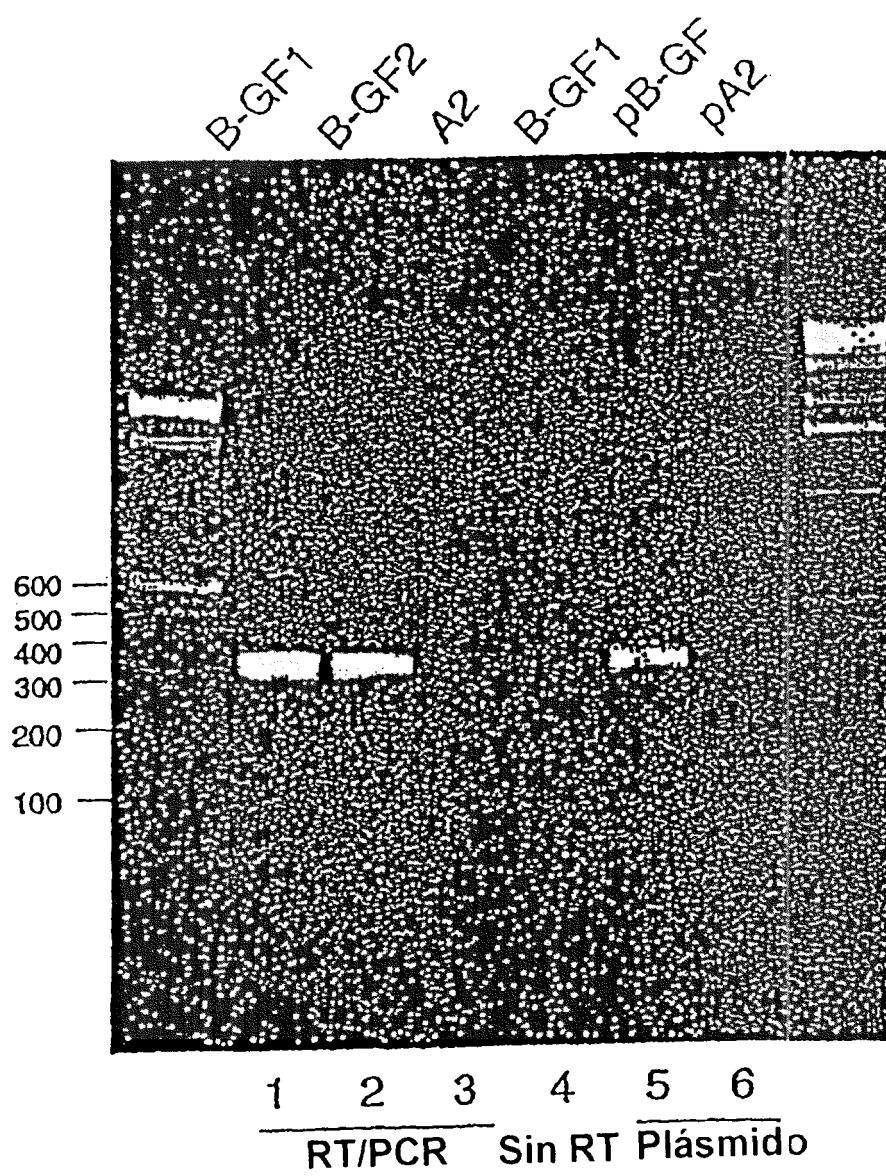
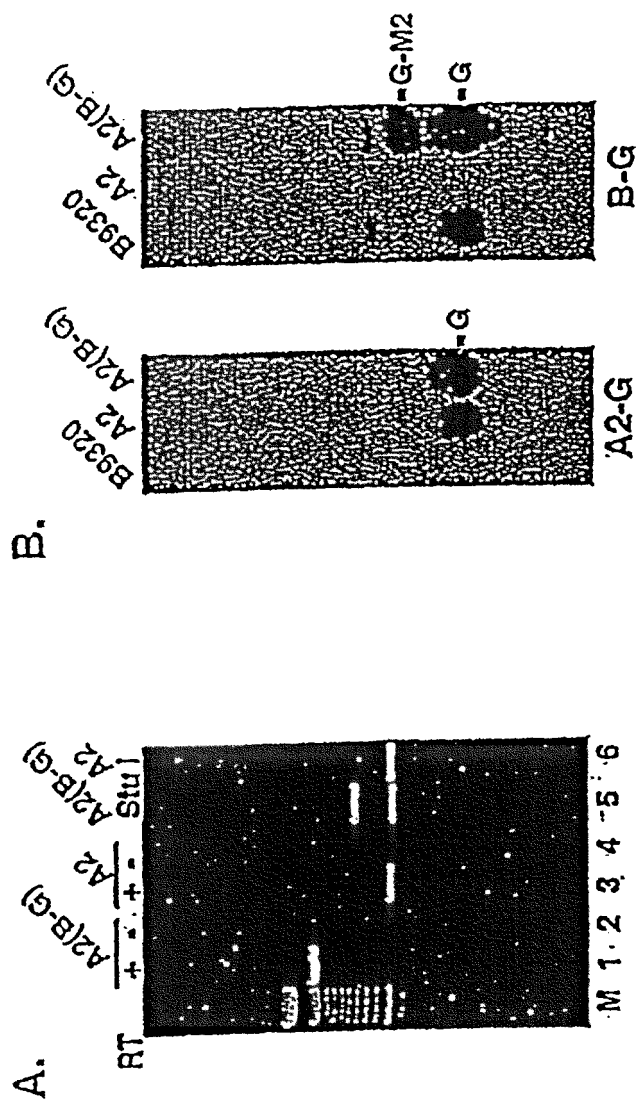


FIG. 5



FIGURAS 6A-B

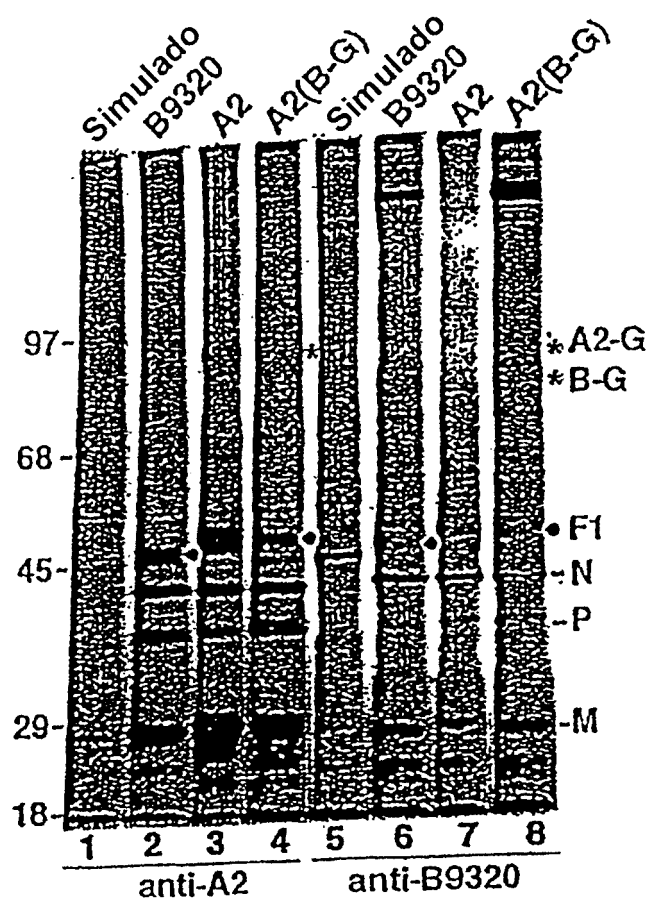


FIG. 7

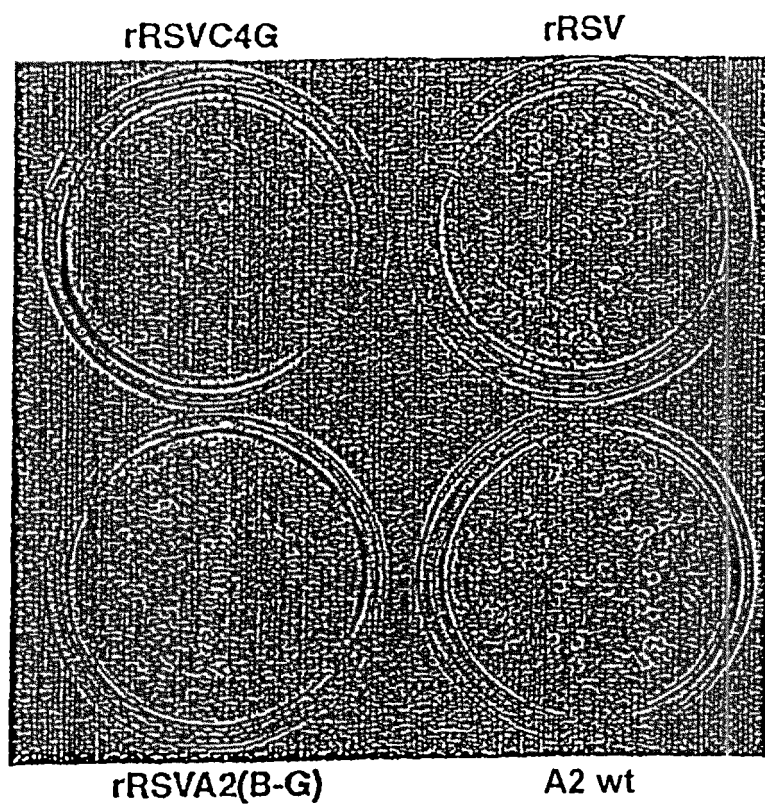


FIG. 8

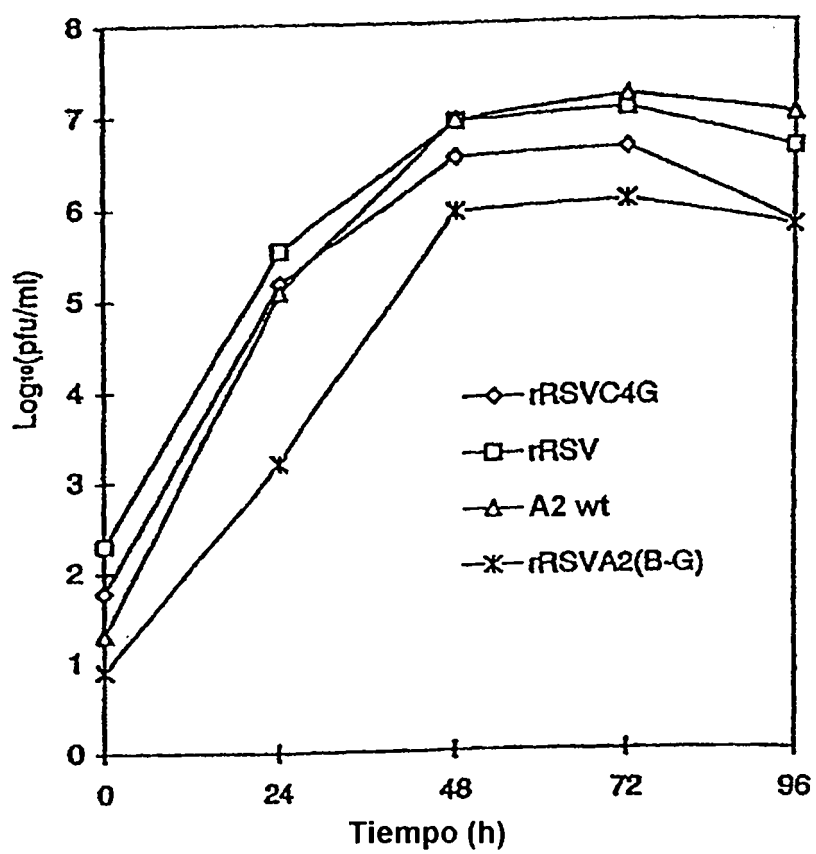


FIG. 9

MDPIINGNSANVVLT DSYLKGVISFSECNA LGSYIFNGPYLKNDY TNLISRONPLEHEMN LKKNITQSLISKYH 75
 KGEIKLEETPYFQSL LMTYKSMTSSEQLAT TNLKKIIRRAIEIS DVKYYAILNKLGLKE KDKIKSNNGOEDENS 150
 VITTIKIDILSAVK DQSHLKADKNHSTK QKDTIKTTLAKLMC SMQHPSPWLHWFNL YTKLNNILLQYRSNE 225
 VKNHGFTLIDNQTLG GQFQILNQYGCIVYH KELKRITVTYVNOFL TWKDISLSRLNVCLI TWISNCLTNKSLG 300
 LRCGFENNVILTQFL YGDCILKLPHEGFI IIKVEGFIINSLIN IIEEDQFKEFEFVNSM LNNITDAANKAQNL 375
 LSRVCHTLLDKTVSD NHINGRWILLSKEL KILKLAGDNVNLNLS ELYFLFRIFGHPVD EQQAMDAVKINCNET 450
 KFYLLSSLMLRGAF IYRIKGFVNNYRW PTLRNATVLPRLWT YYCANTYPSLLELLE RDLIVLSGLRFYREF 525
 RLPKKVDLEMIINDK AISPKNLITWSPR NYMPSHIQNYTEHEK LKFSSEDSKSRVRLEY YLRDNKFNCECDLYNC 600
 VVNQSYLNNFNHVS LTGKEBELSVGRMFA MQPGMFRQVQILAEK MIAENILQFFPESLT RYGDLELQKILEKA 675
 GISNKSNNRYNDNANN YISKCSIITDLSKEN QAFRYETSICSDVL DELHGVQSLFSWLHL TIPHVTIICTYRHAP 750
 PYIGDHIVDLNNVDE QSGLYRYHMGIEGW CQKLNTIEAISLIDL ISLKGKFSITALING DNQSIDISKPIRLME 825
 GQTHAQADYLLAINS LKLLYKEVAGIGHKL KGTETVYSRDNQFMS KTIQHNQVITYPASIK KVLRVGPWINTILDD 900
 FKVSLESIGSLTQEL EYRGESLLCSLIFRN VMLNQLALQKNHA LQNNKLYLDILKVLK HLKTFNLDNIDTAL 975
 TLYANLPMLEGGDP NLLYRSFYRTTDFL TEALVHVSFVILSYT NHDLDKDLQDLSPDR LAKFLTCIITFDQNP 1050
 NAEFVTLMDPQALG SERQAKTSEINRLA VTEVLSTAPNKIFSK SAQHYTTTEIDLNDI MNIEPTYPHGLRVV 1125
 YESLPFYKAETVNL ISGTXSTINILEKTS AIDLTDIDRATENMR KNITLLIRILFLPCN RDKREILSMENLSIT 1200
 ELSKYVREBSWLSN IVGVTSRPSIMYTDI KYTSTISSGIIIEK YNVNSLTRGERGPTK FWGSSQELKKTMPV 1275
 YNRQVLTCKQRDQID LLAKLWVYASIDNK DEFEBELSIGTLGLT YEKAKCLFPQYLSVN YLHRLTVSSRCPCEFP 1350
 ASIPAYRTYNNHEDT SPINRILTEKYGDED IDIVFQNCISFGLSL MSVVEQFTNVCPNRI ILIPKCNELHMKPP 1425
 IFTGDVDIHKQVI QKHMFLEPKISLTQ YVELEFSLNKTLSGS HANSNLLAHKISDY FHNTYILSTNLAGHW 1500
 ILIIQLMKDSKGIFE KDWGEGYITDHFNTN LKVFENAXKYLLCF HKGYGKAKLECDMNT SDLLCVLELIDSSYW 1575
 KSMKVFLEQKVIKY TLSQDASLHRVKGCH SEKLWFLKRLNVAEF TVCPWVNVNIDYHPH MKAILTYIDLVRMGL 1650
 INIDRITHIKNKKFN DEFYTSNLEFYTNXNF SDNTHLLTKHIRIAN SELENNYNKLYHPTP ETLENILLANPIKSND 1725
 KXTLNDYCIQGNVDS TMLPLLSNKKLIKSS AMIRTNYSKQDLXNL FPMVVVIDRIIDHSGN TAKSNQLYTTTSHQI 1800
 SLVHNSTSLYCMLPW HHINRFNFVSSGTC KISIEYILKDLKID PNCFIAGIEGAGNLL LRTVVELHPDIRYIY 1875
 RSLKOCNDHSLPIEF LRLYNGHINIDYGEN LTIPATDATNNIHS YLHIKFAEPISLFVC DAELSUTVWWSKII 1950
 EWSKHVRKCKYCSSL NKCMILVICHQADDDI DFKLDNITILAKTYVC LGSKLKGSSEVILVLT IGPANIFFVFNVVQN 2025
 AKLILSRTHFIMPX KADQESIDANKSLI PFLOCYPTTKGINTA LSKLKSUVSGDILSY SIAGRNEVFSNKLIN 2100
 HKHMANILKWFENHVLN FRSTELNYNHLYMVE STYPLISELINSULTT NELKLIKITGSLLY NFNHE 2165

III Haces cargados (los aminoácidos que están subrayados fueron cambiados por alaninas)
 III Mutaciones en cpts-248/404
 III Mutación en cpts530

FIG. 10

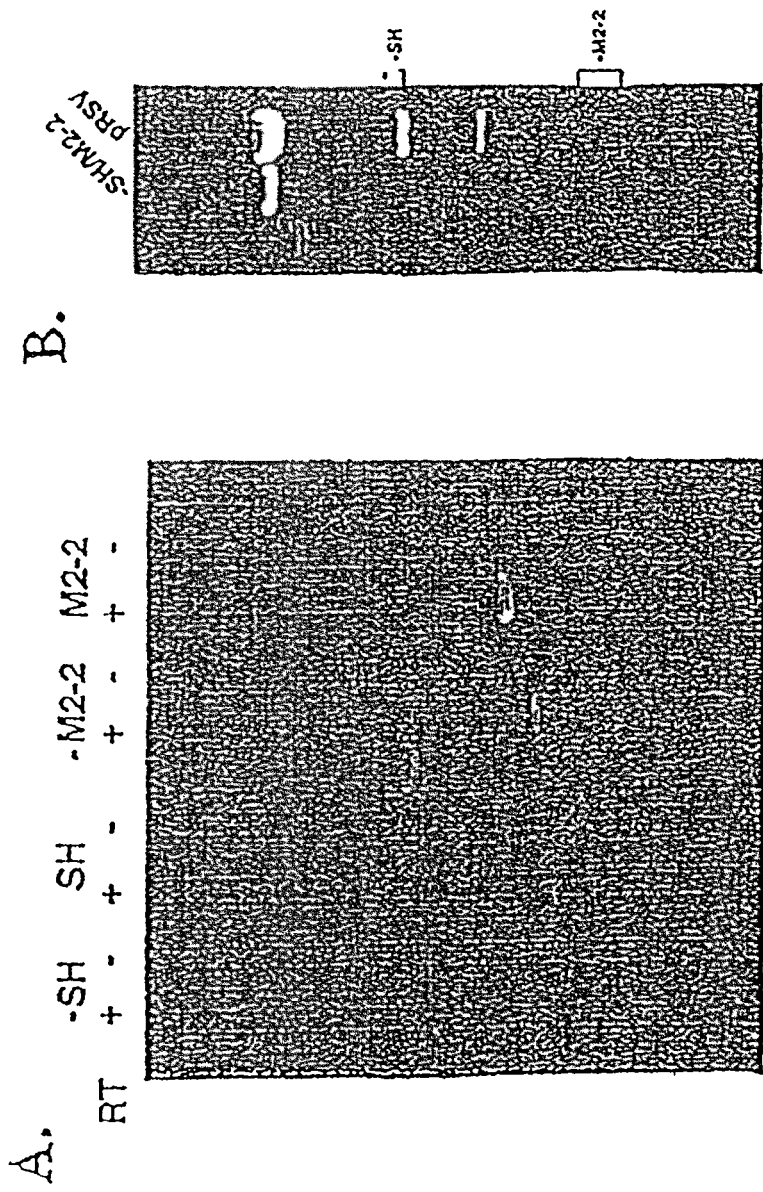
MDPIINGNSANVYL	DSYLKGVISFSECNA	LGSYIFNGPYLXNDY	TNLSRQNPLETHMN	LKKLNTQSLISKYH	75
KGEIKLEETPYFQSL	LMTYKSMTSSEQIAT	TNLLKKTIRRAIEIS	DVKVYAILNKLGLKE	KDKIKSNGQDEDNS	150
VITTIIXODDILLSAVK	DNQSHLXADKNHSTK	QKDYTKITLTKLXMC	SMQHPSPWLTHWNL	YTKLNNILTQYRSNE	225
VKNHGFTLIDNQTL	GFQFIINQYGCIVYH	KELKRITVTVTNQFL	TWKDISLSRLNVCLI	TWISNCLNTANKSLG	300
LRCGNNVILLTQLEL	YGDCILKLEHNEGEY	IIKEVEGFINSLLIN	ITEEDQFRKRFYNSM	LNNITDAANKAQKNL	375
LSRVCHTLDDKTVD	NIINGRWILLISKFL	KLKLAGDNNNLNL	ELYFLRIFGHPMVD	ERQAMDVAKINQNET	450
KFYLLSSLSMLRGAF	TYRITKGFVNMYNRW	PTLRNATVLELRMLT	YYKLNTYPSLLELTE	RDLIVLSGLRFYREF	525
RLPKKVDLEMIINDK	AISPPKNLIWTSFPR	NYMPSHIQNYIEHEK	LKFSSEDKSRRVLEY	YLRDNKFNEDLYNC	600
VVNQSYLANNPHVVS	LTKGERELSVGRMFA	MQPGMERQVQILAEK	MIAENILQFFPESLT	RYGDLELQKILELKA	675
GISNKSNNRYNDVANN	YISKCSIITDLSKEN	QAFRYETSICSDVL	DELHGVSQSLFSWLHL	TIPHVTIICTYRHAP	750
PYIGDHIVDLNNVDE	QSGLYRTHMGGEHW	QOKLWITBALSLLDL	ISLKGKFSITALING	DNQSIDISKPIRLME	825
GQTHAQADYLLALNS	LKLLYKEYAGIGHKL	KGTETYISRDMMQMS	KTIQHNGVYYYPASIK	KVLRVGPWINTILOD	900
FKVSLESIGSLTQEL	EYRGESLLQSLIFRN	VWLYNQIALQLKNHA	LCNRKLYLDDILKVLK	HLKTFENLDNIDTAL	975
TLXANLPMLEFGGDP	NLLYRSFYRRTPDEL	TEALVHSVFILSYYT	NHDLKDKLQDLSDDOR	LNKFLTCTIITFDKNP	1050
NAEFVTLMRDPQALG	SERQAKITSEINRLA	VTEVLSTAPNKFISK	SAQHYTTTEIDLNDI	MONTEPTYPHGLRVV	1125
YESLPFYKAEKIVNL	ISGTSITNILEKTS	AIDUTDIDRATENMR	KNITLLIRILPLDQN	ROKREILSMENLSIT	1200
ELSKVVRERSWSLSN	IVGVTSPTMYTMDI	KYTTSTISSGIIEK	YNNSLTRGERGPTK	PWVGSSTQEKKTMPV	1275
YNRQVLTCKQRDQID	LLAKLDWVYASIDNK	DEFMEELSIGTLGLT	YEKAKKLEFPQYLSVN	YLHRLTVSSRPQEFPP	1350
ASIPAYRTTYTHFTD	SPINRILTEKYODED	IDIVFQNCISFGLSL	MSVVEQFTNVCPNRI	ILTPKLINEIHLKPP	1425
IFTGDVDIHKLKQVI	QKQHMFLPKISLTQ	YVEFLSNKELKSGS	HVNSNLILAHKISDY	FHNTYLLSTNLAGHW	1500
ILLIQLMKDSKGIFE	KDWGEGYITDHFIFN	LKVFFNAYKTYLLCF	HKGYGKAKLECDMNT	SDLLGVLELIDSSYW	1575
KSMKSVFLEQKVIKY	LLSQDASLHRVKQCH	SEKLAFTKRLNVAEF	TVCFWVNVNIDYHPTH	MKAILTYIDLVRMGL	1650
INIDRLTHIKNKHEN	DEFYTSNLFYINYNF	SDNTHILYKHIRIAN	SELENNYNKLYHPTP	ETLENILANPIKSND	1725
KKTLNDYCIIGKNVDS	IMLPLLSNKKLIKSS	AMIRTNYSKQDLYNL	FBMVVIDRIIDHSGN	TAKSNQLYTTTSHQI	1800
SLVHNSSTSLYCMPLW	HHINRENFVFSSTGC	KISIEYLKDLKIKD	PNCIAFIGEGAGNLL	JRTVVVELHPDIRIYI	1875
RSLLKDCNDHSLPIER	LRLYNGHINIDYGEN	LTIPTATDATNNIHS	YLHIKPAEPISLFVC	DABLSTVTNWSKIII	1950
EWESKVRKCKYCQSSV	NKCMILVKKHAQDDI	DFKLDNITILKTYVC	LGSKLKGSSEVYLYLT	IGPANIFFVFNVQN	2025
AKLLLSRTKNFIMPK	KADKESIDANIKSLI	PFLCYPTFKKGINTA	LSKLKSVSVSGDILSY	SIAGRNEVFSNKLIN	2100
HKHNTILKWFENHVLN	FRSTELNYNHLYMVE	STYPYLSSELNLSLTT	NELKULIKITGSLLY	NFHNE	2165

C Restos de cisteína

C Restos de cisteína que fueron cambiados por valina o ácido aspártico

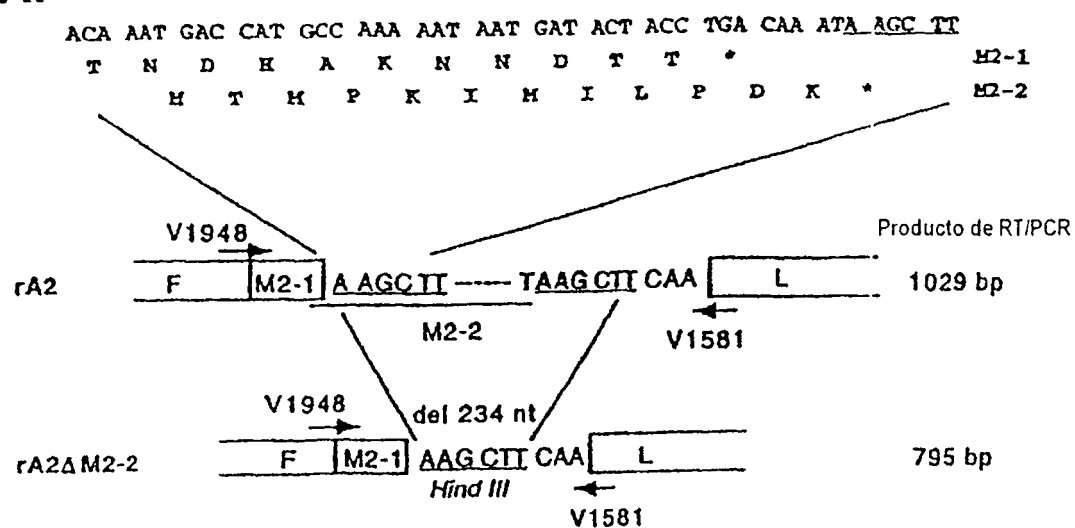
C Resto de cisteína suprimido

FIG. 11



FIGURAS 12A-B

A.



B.

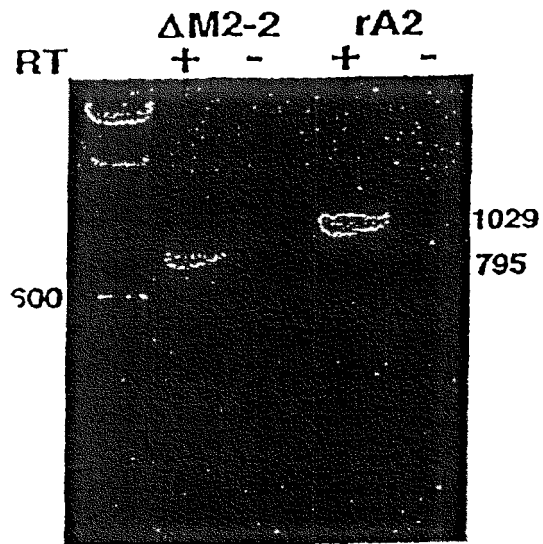


FIG. 13

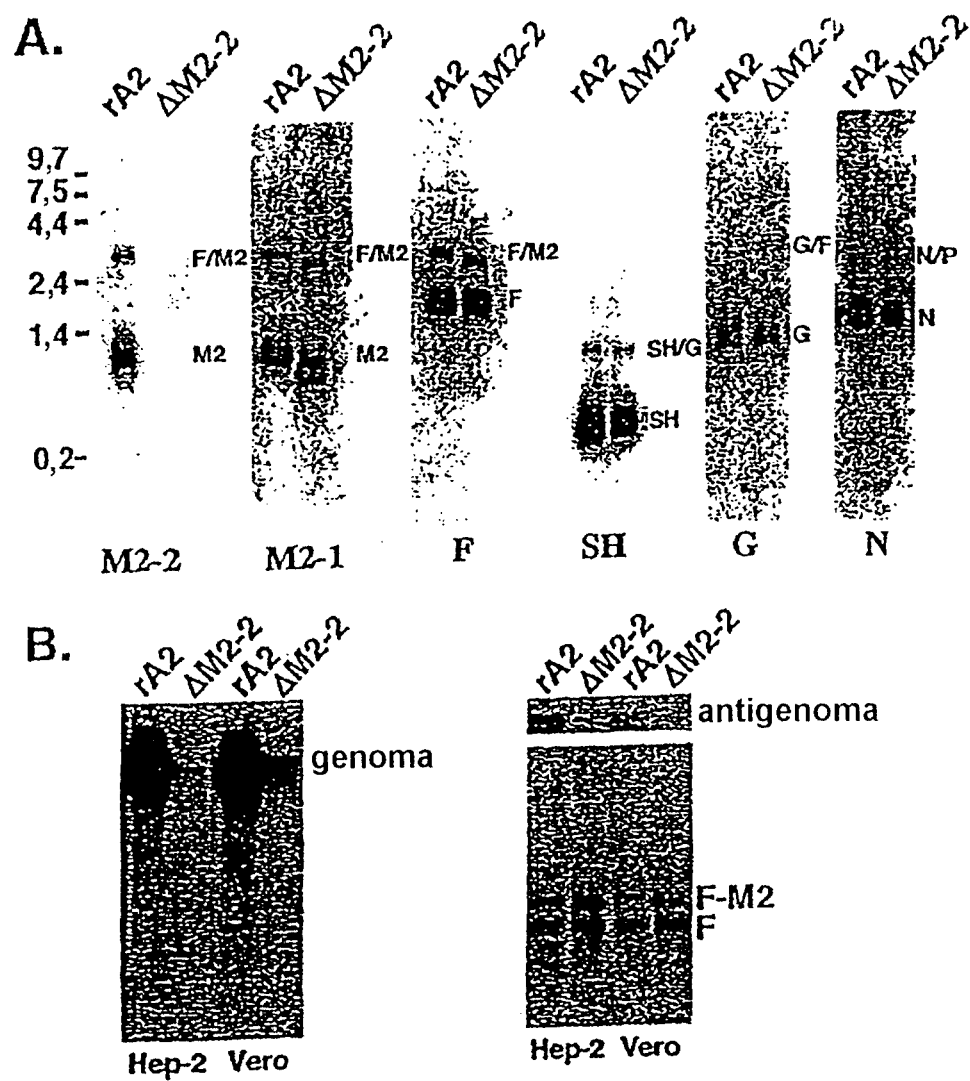


FIG. 14

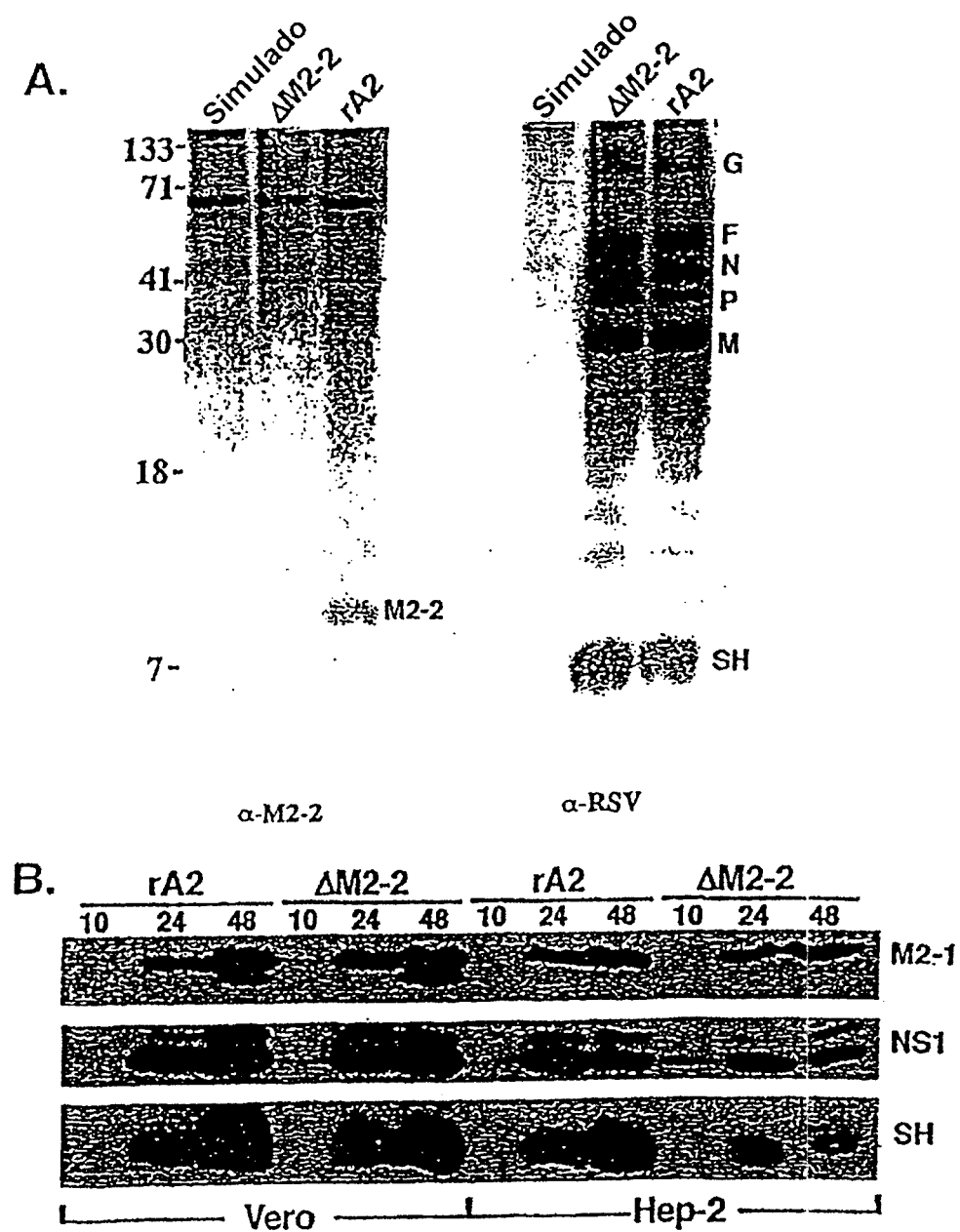


FIG. 15

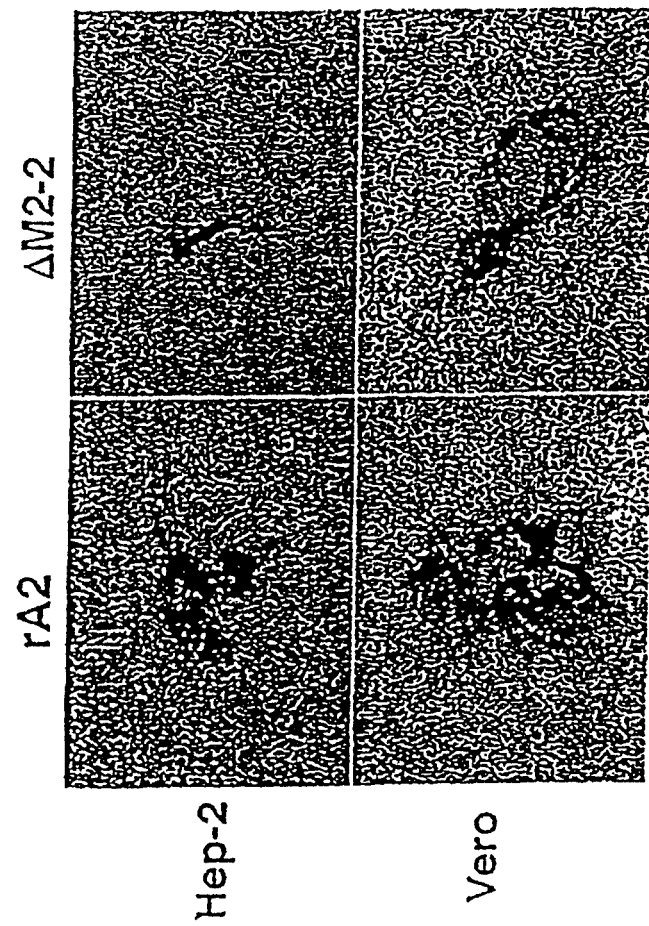


FIG. 16

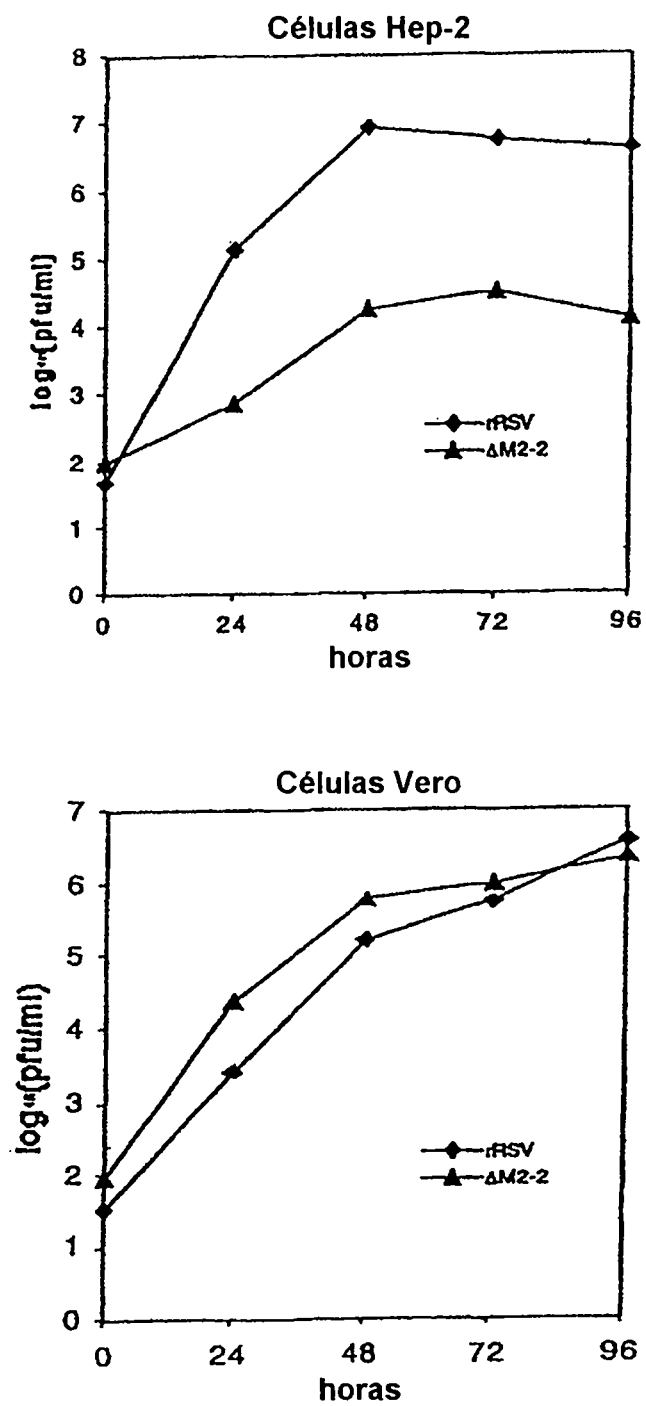


FIG. 17

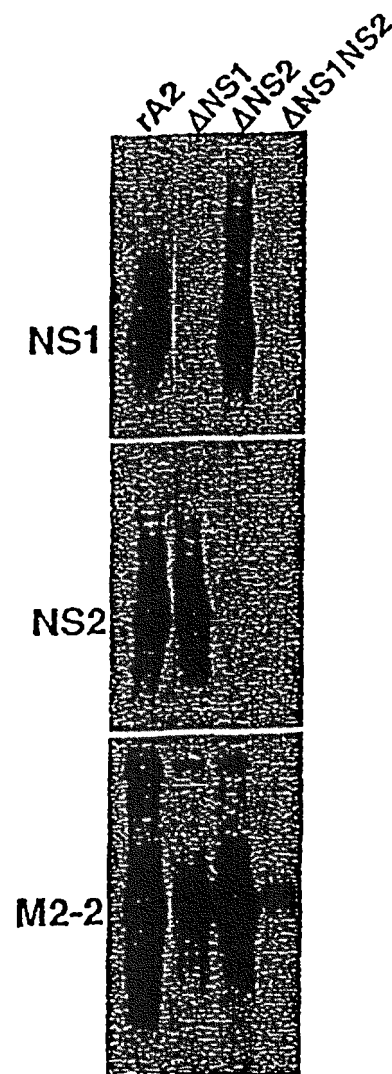


FIG. 18

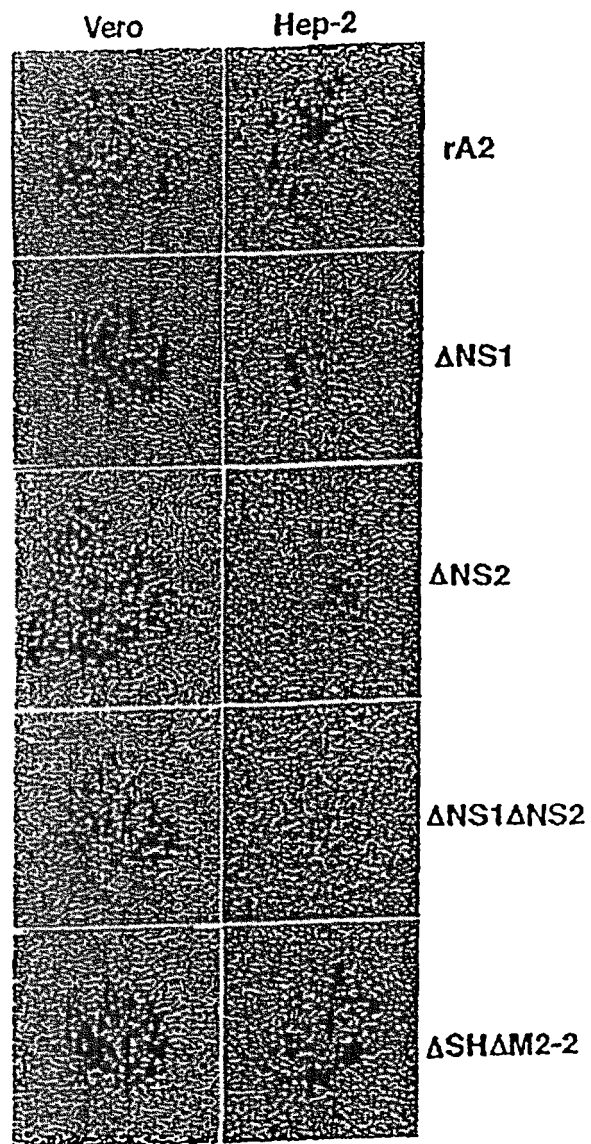


FIG. 19

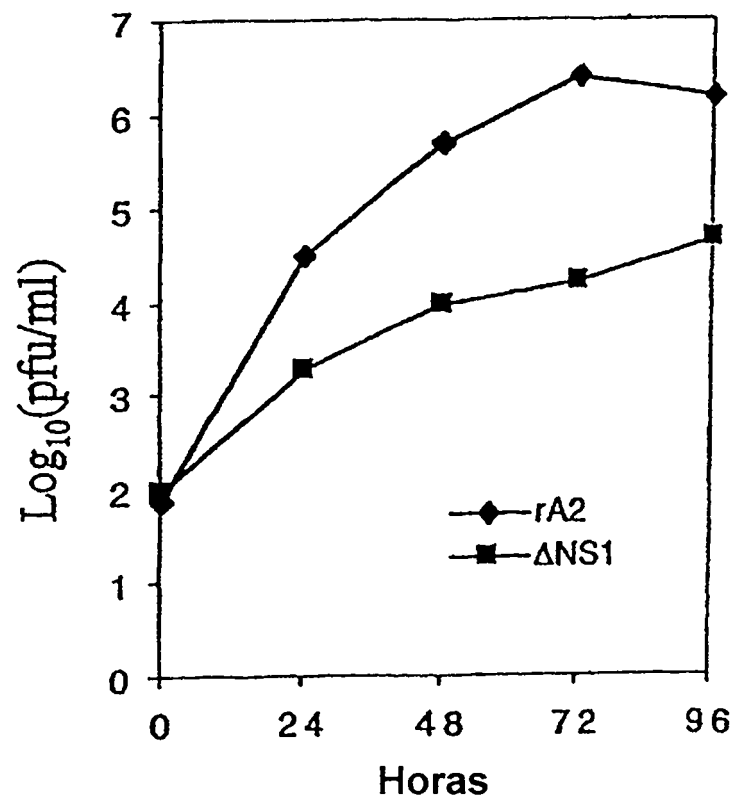


FIG. 20

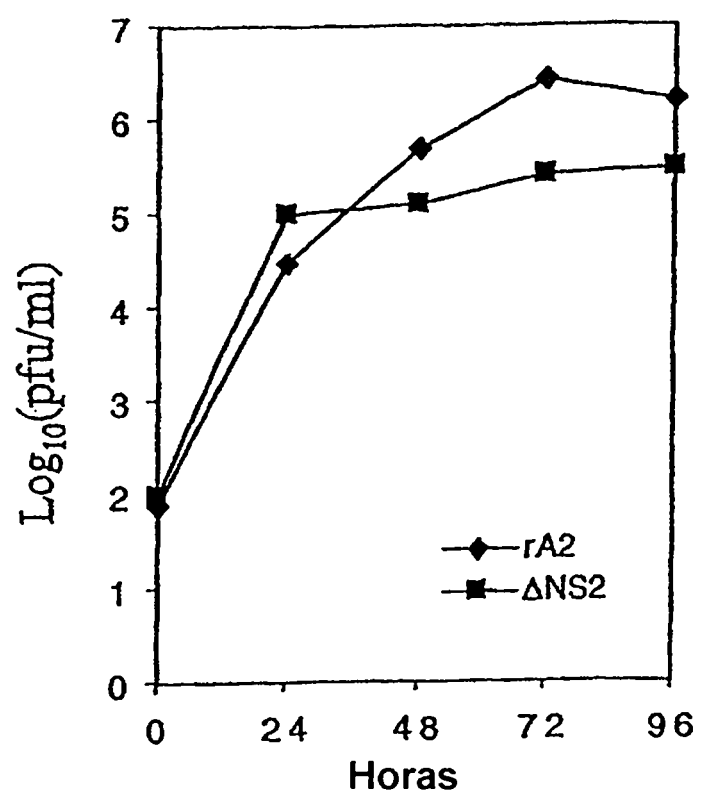


FIG. 21

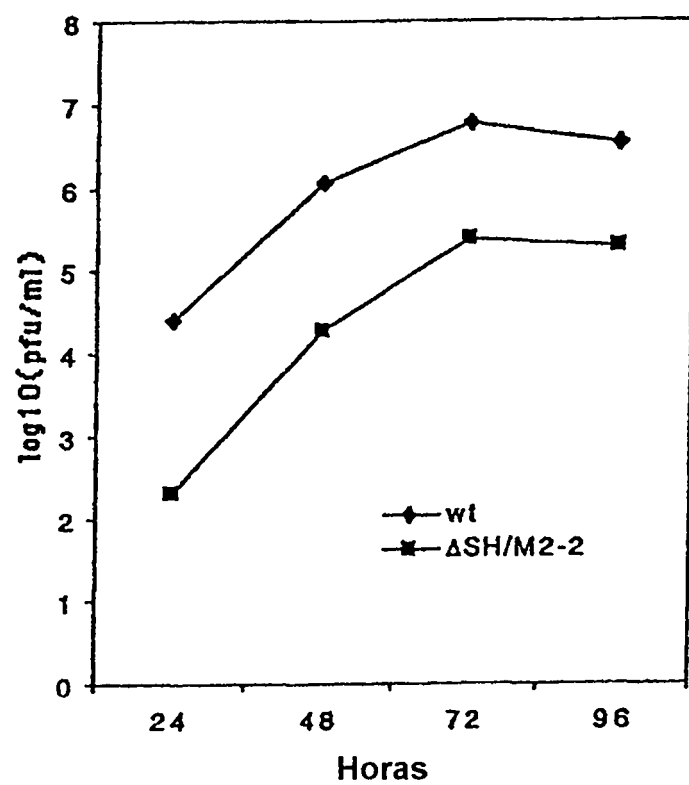


FIG. 22

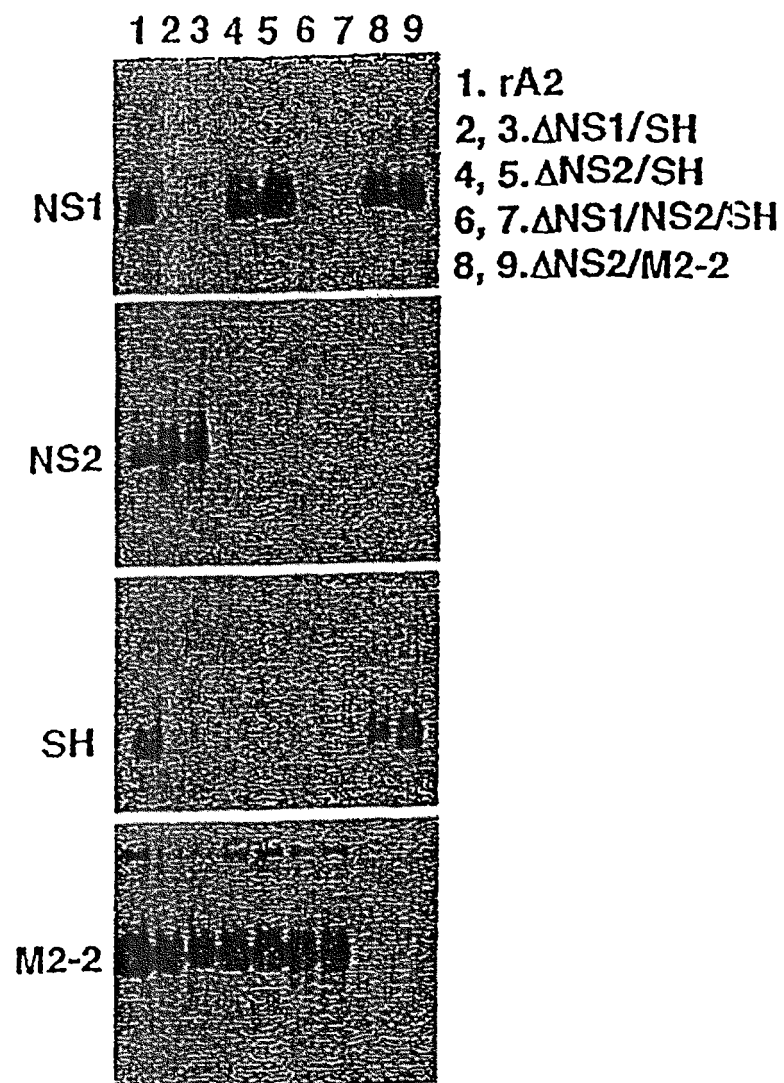


FIG. 23

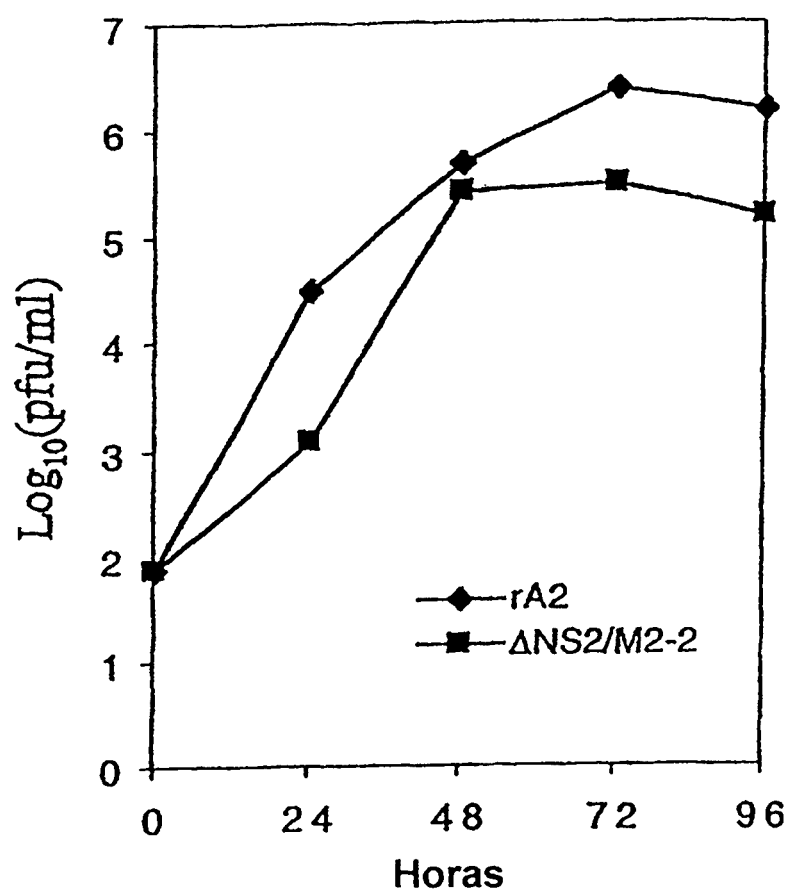


FIG. 24

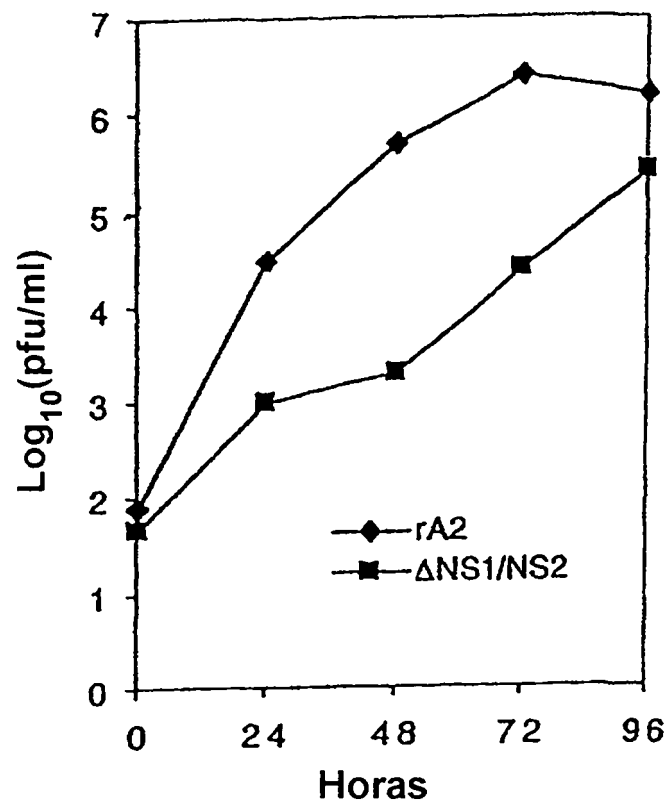


FIG. 25

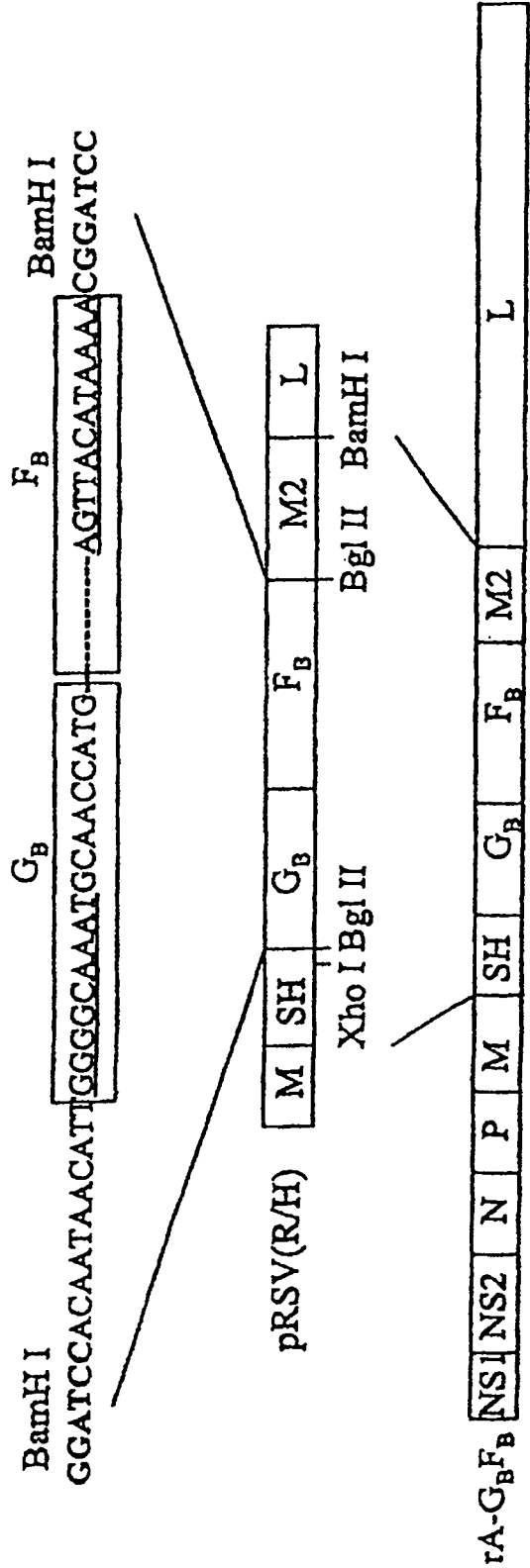


FIG. 26

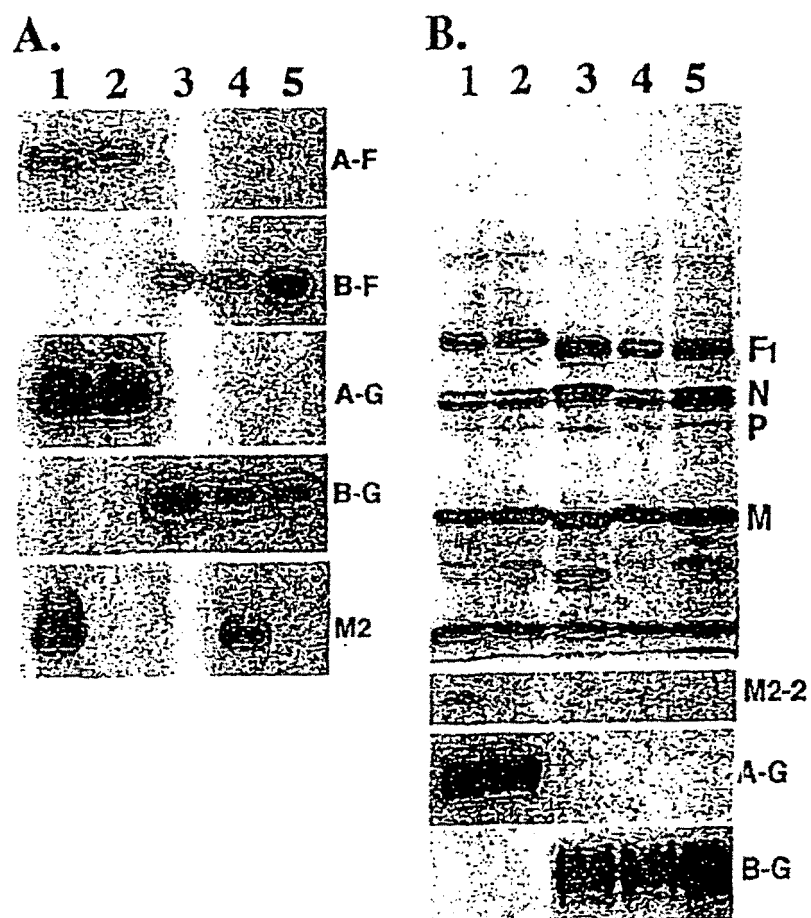


FIG. 27

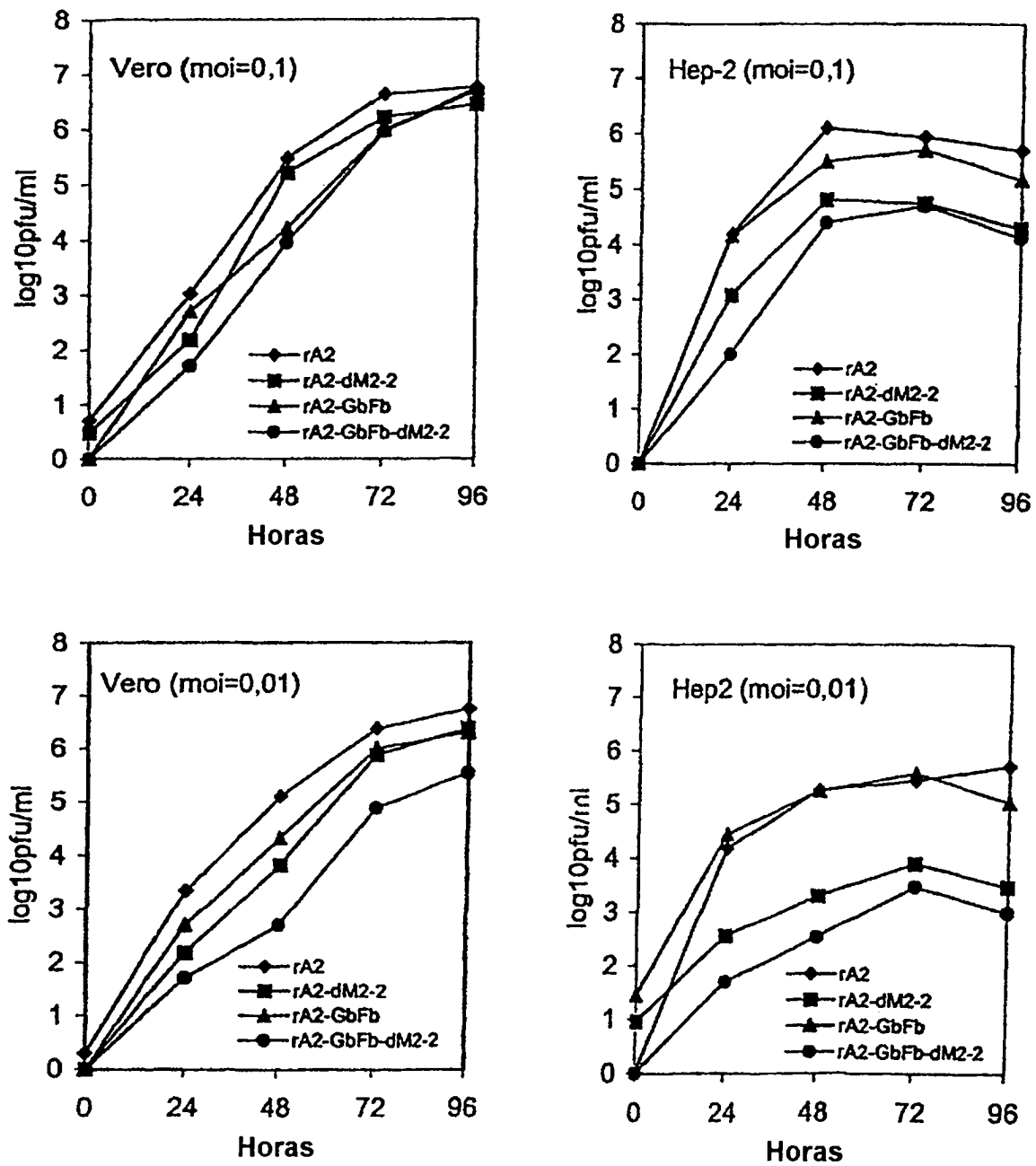


FIG. 28

ES 2 291 370 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Aviron, Inc.	
5	<120> Sistemas de expresión y vacunas de virus RSV recombinante	
	<130> PC/P12940EP	
10	<140> EP01986054	
	<141> 28-11-2001	
	<150> PCT/US01/44819	
15	<151> 28-11-2001	
	<150> 09/724.416	
20	<151> 28-11-2000	
	<160> 66	
	<170> PatentIn versión 3.0	
25	<210> 1	
	<211> 46	
	<212> DNA	
30	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
35	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 1	
40	cgacgcatat tacgcgaaaa aatgcgtaca acaaacttgc ataaac	46
	<210> 2	
	<211> 50	
	<212> DNA	
45	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 2	
55	caaaaaaatg gggcaaataa gaatttgata agtaccactt aaatttaact	50
	<210> 3	
	<211> 24	
60	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
65	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	

ES 2 291 370 T3

	<400> 3	
	ctagagttaa atttaagtg tact	24
5	<210> 4	
	<211> 50	
	<212> DNA	
10	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
15	<400> 4	
	tatcaaattc ttattgccc cattttttg gtttatgcaa gttgttgta	50
20	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> DNA	
25	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 5	
	cgcattttt cgcgtaatat gcgtcggtac	30
35	<210> 6	
	<211> 50	
	<212> DNA	
40	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
45	<400> 6	
	gtattcaatt atagtatta aaaattaaaa atcatataat ttttaaata	50
50	<210> 7	
	<211> 50	
	<212> DNA	
55	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
60	<400> 7	
	acttttagtg aactaatcct aaagttatca tttaatctt ggaggaataa	50
65	<210> 8	
	<211> 50	

ES 2 291 370 T3

	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 8	
10	atttaaacc taatctaatt gggttatatg tgtattaact aaattacgag	50
	<210> 9	
15	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 9	
25	atattagttt ttgacacttt tttctcgtt atagttagtc gtatta	46
	<210> 10	
30	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 10	
40	agcttaatac gactcactat aacga	25
	<210> 11	
45	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 11	
55	gaaaaaaagt gtcaaaaact aatatctcgt aatttagtta atacacatat	50
	<210> 12	
60	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	

ES 2 291 370 T3

	<400> 12	
	aaaccaatta gattaggggt taaatttatt cctccaagat taaatgata	50
5	<210> 13	
	<211> 50	
	<212> DNA	
10	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
15	<400> 13	
	actttaggat tagtcacta aaagttattt aaaaaattat atgatttta	50
20	<210> 14	
	<211> 29	
	<212> DNA	
25	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 14	
	attttaata actataattg aatactgca	29
35	<210> 15	
	<211> 40	
	<212> DNA	
40	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
45	<400> 15	
	ggggccggc atgggtccag cgctggggac catgccggcc	40
50	<210> 16	
	<211> 48	
	<212> DNA	
55	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
60	<400> 16	
	ctcgtggcg cgggtgggc aacagtgtgc ccagccggcg ccagcgag	48
65	<210> 17	
	<211> 48	

ES 2 291 370 T3

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 17

10

ttcgcagggg accgtccct cggtagcgag gggacgggtcc cctcggaa

48

<210> 18

15 <211> 48

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 18

25

aatggcgaat gggacgtcga cagcgctgtc gacgtccat tcgccatt

48

<210> 19

30 <211> 42

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 19

40

taacaaagcc cgaaggaagc tagcttcctt cgggctttgt ta

42

<210> 20

45 <211> 42

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

50 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 20

55

gagttgctgc tgccaccgtt gcaacggagg cagcagcaac tc

42

<210> 21

60 <211> 46

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

ES 2 291 370 T3

	<400> 21	
	agcaataact agataacctt gggcccaagg ttatctagtt attgct	46
5	<210> 22	
	<211> 48	
	<212> DNA	
10	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
15	<400> 22	
	cctctaaacg ggtcttgagg gtctagaccc tcaagaccg ttagagg	48
20	<210> 23	
	<211> 42	
	<212> DNA	
25	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
30	<400> 23	
	ttttgctgaa aggaggaact atagttcctc ctttcagcaa aa	42
35	<210> 24	
	<211> 42	
	<212> DNA	
40	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
45	<400> 24	
	tatgcggccg cgtcgacggt ataccgtcga cgcggccgca ta	42
50	<210> 25	
	<211> 36	
	<212> DNA	
55	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
60	<400> 25	
	ccgggccccg cttcgaagct tcgaaggcgg gcccg	36
65	<210> 26	
	<211> 21	

ES 2 291 370 T3

	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 26	
10	caccacctac cttactcaag t	21
	<210> 27	
15	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 27	
25	ttgtttgtg ggtttgatgg ttgg	24
	<210> 28	
30	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 28	
40	gatatcaaga tctacaataa cattggggca aatgc	35
	<210> 29	
45	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 29	
55	gctaagagat ctttttgaat aactaagcat g	31
	<210> 30	
60	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	

ES 2 291 370 T3

	<400> 30	
	tcttgactgt tgtggattgc aggggtgact tgactccgat cgatcc	46
5	<210> 31	
	<211> 49	
	<212> DNA	
10	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
15	<400> 31	
	cttggtgtgt tgttgatgg tgtgtttctg attttgtatt gatcgatcc	49
20	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> DNA	
25	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 32	
	tcacgaagga atcctggcaa atttgaaatt cga	33
35	<210> 33	
	<211> 33	
	<212> DNA	
40	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
45	<400> 33	
	gaaattcgag gtcatggttt aaatgtaag agg	33
50	<210> 34	
	<211> 36	
	<212> DNA	
55	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
60	<400> 34	
	tgcttaaagt gtaagagggg acattttagt cataat	36
65	<210> 35	
	<211> 33	

ES 2 291 370 T3

	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 35	
10	actaaacaat cagcaggtgt tgccatgagc aaa	33
	<210> 36	
15	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 36	
25	gagctaaatt cacccaagat aagcttgtaa taaactgtca tatcatatat tg	52
	<210> 37	
30	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 37	
40	caaactatcc atctgtaata aagcttgcca gcagacgtat tg	42
	<210> 38	
45	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 38	
55	ccatcaacaa cccaaaataa taaagcttta gtgatacaaa tgaccatgcc	50
	<210> 39	
60	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	

ES 2 291 370 T3

	<400> 39	
	atcaggatcc acaataacat tggggcaaat gcaacc	36
5	<210> 40	
	<211> 36	
	<212> DNA	
10	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
15	<400> 40	
	ctggcattcg gatccgtttt atgtaactat gagttg	36
20	<210> 41	
	<211> 40	
	<212> DNA	
25	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 41	
	gaggtgaggt acaatgcatt aatagcaaga tggaggaaga	40
35	<210> 42	
	<211> 40	
	<212> DNA	
40	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
45	<400> 42	
	cagaagcaaa acaaaatgtg actgcagtga ggattgtggt	40
50	<210> 43	
	<211> 17	
	<212> DNA	
55	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
60	<400> 43	
	gtttaacacg tgggtgag	17
65	<210> 44	
	<211> 17	

ES 2 291 370 T3

	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 44	
10	acatataggc atgcacc	17
	<210> 45	
15	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 45	
25	gcaaaatgga tccatt	17
	<210> 46	
30	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 46	
40	tggttggtat accagtgt	18
	<210> 47	
45	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 47	
55	taccaagagc tcgagtca	18
	<210> 48	
60	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	

ES 2 291 370 T3

	<400> 48	
	ggtggccggc atggtcccag c	21
5	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
15	<400> 49	
	tttaccatat gcgctaatgt	20
20	<210> 50	
	<211> 19	
	<212> DNA	
25	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
30	<400> 50	
	acgcgaaaaa atgcgtaca	19
35	<210> 51	
	<211> 18	
	<212> DNA	
40	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
45	<400> 51	
	acgagaaaaa agtggcaa	18
50	<210> 52	
	<211> 17	
	<212> DNA	
55	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
60	<400> 52	
	ctcaccacgt gttaaac	17
65	<210> 53	
	<211> 17	

ES 2 291 370 T3

	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 53	
10	ggtgcatgcc tatatgt	17
	<210> 54	
15	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 54	
25	aatgggatcc atttgtcc	19
	<210> 55	
30	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 55	
40	aacactggta taccaacca	19
	<210> 56	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 56	
55	acattagcgc atatggtaaa	20
	<210> 57	
60	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	

ES 2 291 370 T3

<400> 57

atcaggatcc acaataacat tggggcaaat gcaacc

36

5

<210> 58

<211> 36

<212> DNA

10 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

15

<400> 58

caactcatag ttacataaaa cggatccgaa tgccat

36

20

<210> 59

<211> 2165

<212> PRT

25

<213> Virus

<400> 59

30

```

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

```

45

50

55

60

65

ES 2 291 370 T3

[illegible]

ES 2 291 370 T3

5 660 665 670
 Leu Lys Ala Gly Ile Ser Asn Lys Ser Asn Arg Tyr Asn Asp Asn Tyr
 675 680 685
 Asn Asn Tyr Ile Ser Lys Cys Ser Ile Ile Thr Asp Leu Ser Lys Phe
 690 695 700
 Asn Gln Ala Phe Arg Tyr Glu Thr Ser Cys Ile Cys Ser Asp Val Leu
 705 710 715 720
 Asp Glu Leu His Gly Val Gln Ser Leu Phe Ser Trp Leu His Leu Thr
 725 730 735
 10 Ile Pro His Val Thr Ile Ile Cys Thr Tyr Arg His Ala Pro Tyr
 740 745 750
 Ile Gly Asp His Ile Val Asp Leu Asn Asn Val Asp Glu Gln Ser Gly
 755 760 765
 15 Leu Tyr Arg Tyr His Met Gly Gly Ile Glu Gly Trp Cys Gln Lys Leu
 770 775 780
 Trp Thr Ile Glu Ala Ile Ser Leu Leu Asp Leu Ile Ser Leu Lys Gly
 785 790 795 800
 Lys Phe Ser Ile Thr Ala Leu Ile Asn Gly Asp Asn Gln Ser Ile Asp
 805 810 815
 20 Ile Ser Lys Pro Ile Arg Leu Met Glu Gly Gln Thr His Ala Gln Ala
 820 825 830
 Asp Tyr Leu Leu Ala Leu Asn Ser Leu Lys Leu Leu Tyr Lys Glu Tyr
 835 840 845
 25 Ala Gly Ile Gly His Lys Leu Lys Gly Thr Glu Thr Tyr Ile Ser Arg
 850 855 860
 Asp Met Gln Phe Met Ser Lys Thr Ile Gln His Asn Gly Val Tyr Tyr
 865 870 875 880
 Pro Ala Ser Ile Lys Lys Val Leu Arg Val Gly Pro Trp Ile Asn Thr
 885 890 895
 30 Ile Leu Asp Asp Phe Lys Val Ser Leu Glu Ser Ile Gly Ser Leu Thr
 900 905 910
 Gln Glu Leu Glu Tyr Arg Gly Glu Ser Leu Leu Cys Ser Leu Ile Phe
 915 920 925
 Arg Asn Val Trp Leu Tyr Asn Gln Ile Ala Leu Gln Leu Lys Asn His
 930 935 940
 35 Ala Leu Cys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Asp Ile Leu Lys Val Leu Lys
 945 950 955
 His Leu Lys Thr Phe Phe Asn Leu Asp Asn Ile Asp Thr Ala Leu Thr
 965 970 975
 40 Leu Tyr Met Asn Leu Pro Met Leu Phe Gly Gly Gly Asp Pro Asn Leu
 980 985 990
 Leu Tyr Arg Ser Phe Tyr Arg Arg Thr Pro Asp Phe Leu Thr Glu Ala
 995 1000 1005
 Ile Val His Ser Val Phe Ile Leu Ser Tyr Tyr Thr Asn His Asp Leu
 1010 1015 1020
 45 Lys Asp Lys Leu Gln Asp Leu Ser Asp Asp Arg Leu Asn Lys Phe Leu
 1025 1030 1035 1040
 Thr Cys Ile Ile Thr Phe Asp Lys Asn Pro Asn Ala Glu Phe Val Thr
 1045 1050 1055
 Leu Met Arg Asp Pro Gln Ala Leu Gly Ser Glu Arg Gln Ala Lys Ile
 1060 1065 1070
 50 Thr Ser Glu Ile Asn Arg Leu Ala Val Thr Glu Val Leu Ser Thr Ala
 1075 1080 1085
 Pro Asn Lys Ile Phe Ser Lys Ser Ala Gln His Tyr Thr Thr Thr Glu
 1090 1095 1100
 55 Ile Asp Leu Asn Asp Ile Met Gln Asn Ile Glu Pro Thr Tyr Pro His
 1105 1110 1115 1120
 Gly Leu Arg Val Val Tyr Glu Ser Leu Pro Phe Tyr Lys Ala Glu Lys
 1125 1130 1135
 Ile Val Asn Leu Ile Ser Gly Thr Lys Ser Ile Thr Asn Ile Leu Glu
 1140 1145 1150
 60 Lys Thr Ser Ala Ile Asp Leu Thr Asp Ile Asp Arg Ala Thr Glu Met
 1155 1160 1165
 Met Arg Lys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Arg Ile Leu Pro Leu Asp Cys
 1170 1175 1180
 65 Asn Arg Asp Lys Arg Glu Ile Leu Ser Met Glu Asn Leu Ser Ile Thr
 1185 1190 1195 1200
 Glu Leu Ser Lys Tyr Val Arg Glu Arg Ser Trp Ser Leu Ser Asn Ile

ES 2 291 370 T3

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

ES 2 291 370 T3

1745 1750 1755 1760
 Asn Tyr Ser Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Leu Phe Pro Met Val Val Ile
 1765 1770 1775
 5 Asp Arg Ile Ile Asp His Ser Gly Asn Thr Ala Lys Ser Asn Gln Leu
 1780 1785 1790
 Tyr Thr Thr Thr Ser His Gln Ile Ser Leu Val His Asn Ser Thr Ser
 1795 1800 1805
 Leu Tyr Cys Met Leu Pro Trp His His Ile Asn Arg Phe Asn Phe Val
 1810 1815 1820
 10 Phe Ser Ser Thr Gly Cys Lys Ile Ser Ile Glu Tyr Ile Leu Lys Asp
 1825 1830 1835 1840
 Leu Lys Ile Lys Asp Pro Asn Cys Ile Ala Phe Ile Gly Glu Gly Ala
 1845 1850 1855
 15 Gly Asn Leu Leu Arg Thr Val Val Glu Leu His Pro Asp Ile Arg
 1860 1865 1870
 Tyr Ile Tyr Arg Ser Leu Lys Asp Cys Asn Asp His Ser Leu Pro Ile
 1875 1880 1885
 Glu Phe Leu Arg Leu Tyr Asn Gly His Ile Asn Ile Asp Tyr Gly Glu
 1890 1895 1900
 20 Asn Leu Thr Ile Pro Ala Thr Asp Ala Thr Asn Asn Ile His Trp Ser
 1905 1910 1915 1920
 Tyr Leu His Ile Lys Phe Ala Glu Pro Ile Ser Leu Phe Val Cys Asp
 1925 1930 1935
 25 Ala Glu Leu Ser Val Thr Val Asn Trp Ser Lys Ile Ile Ile Glu Trp
 1940 1945 1950
 Ser Lys His Val Arg Lys Cys Lys Tyr Cys Ser Ser Val Asn Lys Cys
 1955 1960 1965
 Met Leu Ile Val Lys Tyr His Ala Gln Asp Asp Ile Asp Phe Lys Leu
 1970 1975 1980
 30 Asp Asn Ile Thr Ile Leu Lys Thr Tyr Val Cys Leu Gly Ser Lys Leu
 1985 1990 1995 2000
 Lys Gly Ser Glu Val Tyr Leu Val Leu Thr Ile Gly Pro Ala Asn Ile
 2005 2010 2015
 Phe Pro Val Phe Asn Val Val Gln Asn Ala Lys Leu Ile Leu Ser Arg
 2020 2025 2030
 35 Thr Lys Asn Phe Ile Met Pro Lys Lys Ala Asp Lys Glu Ser Ile Asp
 2035 2040 2045
 Ala Asn Ile Lys Ser Leu Ile Pro Phe Leu Cys Tyr Pro Ile Thr Lys
 2050 2055 2060
 40 Lys Gly Ile Asn Thr Ala Leu Ser Lys Leu Lys Ser Val Val Ser Gly
 2065 2070 2075 2080
 Asp Ile Leu Ser Tyr Ser Ile Ala Gly Arg Asn Glu Val Phe Ser Asn
 2085 2090 2095
 Lys Leu Ile Asn His Lys His Met Asn Ile Leu Lys Trp Phe Asn His
 2100 2105 2110
 45 Val Leu Asn Phe Arg Ser Thr Glu Leu Asn Tyr Asn His Leu Tyr Met
 2115 2120 2125
 Val Glu Ser Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Glu Leu Leu Asn Ser Leu Thr
 2130 2135 2140
 50 Thr Asn Glu Leu Lys Lys Leu Ile Lys Ile Thr Gly Ser Leu Leu Tyr
 2145 2150 2155 2160
 Asn Phe His Asn Glu
 2165

- <210> 60
 55 <211> 47
 <212> DNA
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL
 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (5)..(43)
 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Producto de RT/PCR

ES 2 291 370 T3

<400> 60

acaa atg acc atg cca aaa ata atg ata cta cct gac aaa taa gctt 47

5 Met Thr Met Pro Lys Ile Met Ile Leu Pro Asp Lys
1 5 10

<210> 61

<211> 12

10 <212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Producto de RT/PCR

<400> 61

20 Met Thr Met Pro Lys Ile Met Ile Leu Pro Asp Lys
1 5 10

<210> 62

25 <211> 11

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Producto de RT/PCR

<400> 62

35 Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 63

<211> 16

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Producto de RT/PCR

<400> 63

aagctttaag ctcaa

16

<210> 64

<211> 9

<212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Producto de RT/PCR

<400> 64

aagcttcaa

9

ES 2 291 370 T3

	<210> 65	
	<211> 35	
	<212> DNA	
5	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
10	<400> 65	
	ggatccacaa taacattggg gcaaatgcaa ccatg	35
15	<210> 66	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
25	<400> 66	
	agttacataa aacggatcc	19
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		