



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 317 914**

(51) Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01946696 .0**

(96) Fecha de presentación : **22.06.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1294858**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

(54) Título: **Vacunas de virus sincitial respiratorio que expresan antígenos protectores a partir de genes próximos al promotor.**

(30) Prioridad: **23.06.2000 US 213708 P**

(73) Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES National Institute of Health Office of Technology Transfer, Suite 325 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **01.05.2009**

(72) Inventor/es: **Krempl, Christine D.; Collins, Peter L.; Murphy, Brian, R.; Buchholz, Ursula y Whitehead, Stephen, S.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.05.2009**

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

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas de virus sincitial respiratorio que expresan antígenos protectores a partir de genes próximos al promotor.

5 Fundamento de la invención

El virus sincitial respiratorio humano [(abreviadamente en lo sucesivo HRSV, por la expresión inglesa *human respiratory syncytial virus*; análogamente “virus RS” significa virus sincitial respiratorio)] es el principal agente viral de enfermedades graves del tracto respiratorio pediátrico en todo el mundo (Collins, *et al.*, *Fields Virology*, 2:1313-1352, 1996). El RSV sobresale entre todos los otros agentes patógenos microbianos como causa de neumonía y bronquiolitis en bebés de edad inferior a un año. Virtualmente todos los niños son infectados antes de cumplir los dos años, y la reinfección ocurre con apreciable frecuencia en niños mayores y adultos jóvenes (Chanock *et al.*, en *Viral Infections of Humans*, 3rd ed., A.S. Evans, ed., Plenum Press, N.Y., 1989). El RSV es responsable de más de uno de cada cinco ingresos hospitalarios pediátricos debidos a enfermedades del tracto respiratorio, y en los Estados Unidos de América causa anualmente casi 100.000 hospitalizaciones y 4.500 muertes (Heilman, *J.Infect. Dis.* 161: 402-6, 1990). Además hay pruebas de que una grave infección del tracto respiratorio tempranamente en la vida puede iniciar o exacerbar el asma (Sigurs, *et al.*, *Pediatrics* 95:500-5, 1995).

Aunque usualmente se piensa en el RSV humano en el contexto de la población pediátrica, también se reconoce como un agente importante de enfermedad grave en personas mayores (Falsey, *et al.*, *J. Infect. Dis.* 172:389-394, 1995). El RSV humano también causa enfermedad que amenaza la vida en ciertos individuos inmunocomprometidos, tales como los receptores de transplantes de médula ósea (Fouillard, *et al.*, *Bone Marrow Transplant* 9:97-100, 1992).

Para el tratamiento del RSV humano está disponible un agente quimioterapéutico, la ribavirina. Sin embargo, su eficacia y uso es controvertido. Hay también productos sometidos al régimen de licencias para tratar enfermedades por el RSV que están compuestos de mezclas de IgG de donantes (Groothuis, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 329:1524-30, 1993) o un anticuerpo monoclonal específico de RSV humanizado. Estos se administran como agentes de inmunoprofilaxis pasiva a individuos de alto riesgo. Aunque estos productos son útiles, su alto coste y otros factores, tales como falta de eficacia a largo plazo, los hacen inapropiados para un uso general. Otras desventajas incluyen la posibilidad de transmitir virus llevados por la sangre y la dificultad y gasto en su preparación y conservación. Además, la historia del control de las enfermedades infecciosas, y especialmente las enfermedades de origen viral, indica la importancia principal de vacunas.

A pesar de décadas de investigación para desarrollar agentes vacunales eficaces contra el RSV, todavía no se ha conseguido una vacuna eficaz para prevenir la morbilidad grave y la mortalidad significativa asociada con la infección por RSV. El fracaso en desarrollar vacunas satisfactorias se debe en parte al hecho de que los niños pequeños tiene respuestas disminuidas por anticuerpos serológicos y secretores a los antígenos del RSV. Por tanto, estos individuos padecen infecciones más graves por RSV, mientras que la inmunidad acumulativa parece proteger a los niños mayores y a adultos contra impactos más graves del virus.

Los mecanismos de inmunidad en infección por RSV han llegado recientemente a ser un foco de atención. Los anticuerpos secretores parecen los más importantes en proteger el tracto respiratorio superior, mientras que se cree que altos niveles de anticuerpos serológicos tienen un papel principal en la resistencia a la infección por RSV en el tracto respiratorio inferior. Las células T citotóxicas específicas del RSV, otra arma efectora de inmunidad inducida, son también importantes en resolver una infección por RSV. Sin embargo, aunque este último efecto puede ser aumentado por inmunización previa para proporcionar mayor resistencia al enfrentamiento con el virus el efecto es de corta duración. Las glicoproteínas de superficie F y G son los dos principales antígenos protectores del RSV, y son las dos únicas proteínas del RSV que han demostrado inducir anticuerpos neutralizantes del RSV y resistencia a largo plazo al enfrentamiento con el virus (Collins *et al.*, *Fields Virology*, Fields *et al.*, eds., 2:1313-1352, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; Connors *et al.*, *J. Virol.*, 65(3): 1634-7, 1991). La tercera proteína de superficie del RSV, la SH, no inducía anticuerpos neutralizantes del RSV ni resistencia significativa al enfrentamiento con el RSV.

Un obstáculo para desarrollar vacunas vivas del RSV es la dificultad en conseguir un equilibrio apropiado entre atenuación e inmunogenicidad, debido parcialmente a la inestabilidad genética de algunos virus atenuados, el crecimiento relativamente defectuoso del RSV en cultivos de células, y la inestabilidad de las partículas virales. Además, la inmunidad que es inducida por infección natural no es completamente protectora contra la infección subsiguiente. Probablemente contribuye a esto cierto número de factores, incluyendo la ineficacia relativa del sistema inmune en restringir la infección por virus en la superficie luminal del tracto respiratorio, la naturaleza de corta duración de la inmunidad mucosal local, la replicación rápida y extensiva del virus, la respuestas inmunes reducidas en los jóvenes debido a la inmadurez inmunológica, la inmunosupresión por anticuerpos serológicos maternos derivados a través de la placenta, y ciertas características del virus, tales como un alto grado de glicosilación de la proteína G. También, como se describirá a continuación, el RSV humano existe en forma de dos subgrupos antigenéticos A y B, y la inmunidad contra un subgrupo tiene una eficacia reducida contra el otro.

Aunque el RSV puede reinfestar múltiples veces durante la vida, las re-infecciones usualmente se reducen en gravedad debido a la inmunidad protectora inducida por infección previa, y por tanto es factible la inmunoprofilaxis. Una vacuna para RSV viva y atenuada sería administrada intranasalmente para iniciar una infección inmunizante suave. Esto tiene la ventaja de simplicidad y seguridad comparado con una vía parenteral. También proporciona estimula-

ción directa de la inmunidad del tracto respiratorio local, que desempeña un papel principal en la resistencia al RSV. También elimina los efectos inmunosupresores de anticuerpos serológicos derivados maternalmente específicos del RSV, que típicamente se encuentran en los muy jóvenes. Además, aunque la administración parenteral de antígenos del RSV puede algunas veces estar asociada con complicaciones inmunopatológicas (Murphy *et al.*, *Vaccine* 8(5):497-502, 1990), esto nunca se ha observado en virus humanos.

Un virus inactivado con formalina se ensayó contra RSV en los primeros años de la década de 1960, pero fracasó en proteger contra la infección o enfermedad debida a RSV, y de hecho exacerbó los síntomas durante la infección subsiguiente por el virus. (Kim *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 89:422-434, 1969; Chin *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 89:449-463, 1969; Kapikian *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 82: 405-421, 1969).

Más recientemente, el desarrollo de vacunas para el RSV ha centrado la atención en mutantes del RSV atenuados. Friedewald *et al.*, (*J. Amer. Med. Assoc.* 204:690-694, 1968) describieron un mutante del RSV sometido a pases en frío (cpRSV) (cp es la abreviatura de la expresión inglesa *cold passaged*) que parecía estar suficientemente atenuado para ser una vacuna candidata. Este mutante exhibió una eficacia de crecimiento a 26°C ligeramente mayor comparada con su virus parental de tipo silvestre (abreviadamente algunas veces en lo sucesivo wt por la expresión *wild-type*), pero su replicación ni fue sensible a la temperatura ni estaba significativamente adaptada al frío. El mutante sometido a pases en frío, sin embargo, estaba atenuado para adultos. Aunque satisfactoriamente atenuado e inmunógeno para bebés y niños que habían sido previamente infectados con RSV (es decir, individuos seropositivos), el cpRSV mutante retenía una virulencia de bajo nivel para el tracto respiratorio superior de niños seronegativos.

Similarmente, Gharpure *et al.*, *J. Virol.*, 3:414-421, 1969) describieron el aislamiento de mutantes del RSV sensibles a la temperatura (tsRSV) (ts es la abreviatura inglesa de *temperature sensitive*), mutantes que también fueron candidatos prometedores para vacunas. Un mutante, ts-1, se evaluó extensivamente en el laboratorio y en voluntarios. El mutante produjo infección asintomática en voluntarios adultos y confirió resistencia al enfrentamiento con virus de tipo silvestre 45 días después de la inmunización. De nuevo, mientras los bebés y los niños seropositivos experimentaron infección asintomática los bebés seronegativos desarrollaron signos de rinitis y otros síntomas suaves. Además se detectó inestabilidad del fenotipo ts. Aunque los virus que exhiben una pérdida parcial o completa de sensibilidad a la temperatura representaban una pequeña proporción de virus recuperables de individuos vacunados, esto no estaba asociado con signos de enfermedad distintos de la rinitis suave.

Estos y otros estudios revelaron que ciertas cepas del RSV sometidas a pases en frío y sensibles a la temperatura estaban sub-atenuadas y causaban síntomas suaves de la enfermedad en algunos individuos vacunados, particularmente bebés seronegativos, mientras que otras estaban sobre-atenuadas y fracasaron en replicarse suficientemente para desencadenar una respuesta inmune protectora, (Wright *et al.*, *Infect. Immun.*, 37:397-400, 1982). Además, la inestabilidad genética de mutantes candidatos para vacunas ha dado como resultado la pérdida de su fenotipo sensible a la temperatura, impidiendo además el desarrollo de vacunas del RSV eficaces. Véase generalmente, (Hodes *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145:1158-1164, 1974; Mc Intosh *et al.*, *Pediatr. Res.* 8:689-696, 1974; y Belshe *et al.*, *J. Med. Virol.*, 3:101-110, 1978).

Como una alternativa a las vacunas del RSV atenuadas vivas, los investigadores también han analizado candidatos para vacunas constituidos por subunidades que usan glicoproteínas de la envoltura del RSV purificadas. Las glicoproteínas indujeron resistencia a la infección por virus RS en los pulmones de ratas de la raza *algodón*, (Walsh *et al.*, *J. Infect. Dis.* 155:1198-1204, 1987), pero los anticuerpos tenían una actividad neutralizante muy débil y la inmunización de roedores con vacunas de subunidades purificadas condujo a una potenciación de la enfermedad (Murphy *et al.*, *Vaccine* 8:497-502, 1990).

Las vacunas de virus vacinia recombinantes que expresan las glicoproteínas de la envoltura F o G también han sido exploradas. Estos recombinantes expresan glicoproteínas del RSV que son indistinguibles de las correspondientes virales auténticas, y los roedores infectados intradérmicamente con recombinantes F y G de vacinia-RSV desarrollaron altos niveles de anticuerpos específicos que neutralizaban la infectividad viral. Realmente, la infección de ratas de la raza *algodón* con recombinantes vacinia-F estimuló la resistencia casi completa a la replicación del RSV en el tracto respiratorio inferior y una resistencia significativa en el tracto superior. (Olmsted *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7462-7466, 1986). Sin embargo, la inmunización de chimpancés con un recombinante vacinia-F y -G casi no proporcionó protección contra el enfrentamiento al RSV en el tracto respiratorio superior (Collins *et al.*, *Vaccine* 8:164-168, 1990) y una inconsistente protección en el tracto respiratorio inferior (Crowe *et al.*, *Vaccine* 11:1395-1404, 1993).

A pesar de estos diversos esfuerzos para desarrollar una vacuna del RSV eficaz, todavía no se ha aprobado una licencia de vacuna para el RSV. Las promesas no cumplidas de métodos previos apuntan a la necesidad de nuevas estrategias para desarrollar vacunas del RSV, y en particular a métodos para manipular RSV recombinante para incorporar cambios genéticos que proporcionen nuevas propiedades fenotípicas en RSV recombinantes viables, y atenuados. Sin embargo, hasta ahora ha demostrado ser difícil la manipulación de RNA genómico del RSV y otros virus de RNA de sentido negativo no segmentados. Los principales obstáculos a este respecto incluyen no infectividad del RNA genómico desnudo de estos virus, crecimiento viral defectuoso en cultivos de tejidos, ciclos de replicación largos, inestabilidad de los viriones, un genoma complejo, y una organización refractaria de los productos génicos.

La tecnología del DNA recombinante ha hecho posible recuperar virus de RNA de cadena negativa no segmentados e infecciosos a partir de cDNA, manipular genéticamente clones virales para construir nuevos candidatos para vacunas, y evaluar rápidamente su nivel de atenuación y estabilidad fenotípica (para revisiones de este tema, véanse Conzelmann, *J. Gen. Virol.*, 77:381-89, 1996; Palese *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11354-58, 1996). En este contexto, el rescate recombinante ha sido descrito para el virus sincitial respiratorio (RSV) infeccioso, el virus de la parainfluenza (PIV), el virus de la rabia (RaV), el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus del sarampión (MeV), el virus de la peste *rinder* y el virus Sendai (SeV) -(las abreviaturas entre paréntesis corresponden a las expresiones en inglés)- a partir de RNA antigenómico codificado por cDNA en presencia de proteínas virales esenciales (véase, por ejemplo, Garcin *et al.*, *EMBO J.* 14:6087-6094, 1995; Lawson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:4477-81, 1995; Radecke *et al.*, *EMBO J.* 14:5773-5784, 1995; Schnell *et al.*, *EMBO J.* 13:4195-203, 1994; Whelan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:8388-92, 1995; Hoffman *et al.*, *J. Virol.*, 71:4272-4277, 1997; Pecters *et al.*, *J. Virol.*, 73:5001-5009, 1999; Kato *et al.*, *Genes to Cells* 1:569-579, 1996; Roberts *et al.*, *Virology* 247(1), 1-6, 1998; Baron *et al.*, *J. Virol.*, 71:1265-1271, 1997; publicación de solicitud de patente internacional WO 97/06270; la solicitud de patente Provisional de EE.UU. Nº 60/007.083, presentada el 27 de septiembre de 1995; la solicitud de patente de EE.UU. Nº 08/720.132, presentada el 27 de septiembre de 1996; la solicitud de patente Provisional de EE.UU. Nº 60/021.773, presentada el 15 de julio de 1996; la solicitud de patente Provisional de EE.UU. Nº 60/046,141, presentada el 9 de mayo de 1997; la solicitud de patente Provisional de EE.UU. Nº 60/047.634, presentada el 23 de mayo de 1997; Patente de EE.UU. Nº 5.993.824, expedida el 30 de noviembre de 1999 (correspondiente a la publicación de solicitud de patente internacional WO 98/02530); la solicitud de patente de EE.UU. Nº 09/291.894, presentada por Collins *et al.*, el 13 de abril de 1999; la solicitud de patente Provisional de EE.UU. Nº 60/129.006, presentada por Murphy *et al.*, el 13 de abril de 1999; Collins, *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 92:11563-11567, 1995; Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 71(8):5814-5819, 1997; Durbin *et al.*, *Virology* 235:323-332, 1997; He *et al.* *Virology* 237:249-260, 1997; Baron *et al.*, *J. Virol.*, 71:1265-1271, 1997; Whitehead *et al.*, *Virology* 247(2):232-9, 1998a; Buchholz *et al.* *J. Virol.*, 73:251-9, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 72(5):4467-4471, 1998b; Jin *et al.* *Virology* 251:206-214, 1998; y Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:(4)3438-3442, 1999, y Bukreyev, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96:2367-72, 1999).

Basándose en los desarrollos anteriores, ahora es posible recuperar RSV infeccioso a partir de cDNA y diseñar e implementar diversas manipulaciones genéticas en clones del RSV para construir nuevos candidatos para vacunas. A continuación, pueden evaluarse y ajustarse el nivel de atenuación y estabilidad fenotípica, entre otras características fenotípicas deseadas. El reto que está pendiente es desarrollar un amplio y diverso menú de manipulaciones genéticas que puedan ser empleadas, solas o en combinación, con otros tipos de manipulaciones genéticas, para construir clones del RSV atenuados e infecciosos que sean útiles para un uso amplio en vacunas. En este contexto, sigue existiendo la urgente necesidad en la técnica de herramientas y métodos adicionales que permitirán la manipulación ingenieril de vacunas seguras y eficaces para aliviar los graves problemas de salud atribuibles al RSV. Sorprendentemente, la presente invención satisface esta necesidad proporcionando herramientas adicionales para construir candidatos para vacunas del RSV atenuados e infecciosos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona virus sincitiales respiratorios (RSV) recombinantes que están modificados por desplazamiento de un orden o posición espacial relativa de uno o más genes o segmentos de genoma dentro de un genoma o antigenoma del RSV recombinante para generar un virus recombinante para vacuna que es infeccioso, atenuado e inmunógeno en seres humanos y otros mamíferos. Los RSV recombinantes de la invención comprenden una importante proteína (N) de la nucleocápsida, una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, una proteína (L) polimerasa grande, un factor de prolongación de RNA-polimerasa, y un genoma o antigenoma parcial o completo del RSV recombinante que tiene uno o más genes de glicoproteínas del RSV desplazado posicionalmente dentro del genoma o antigenoma recombinante. En particular, un gen de glicoproteína en dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo está posicionalmente desplazado a la posición 1, respecto al promotor. En ciertos aspectos de la invención, el RSV recombinante se caracteriza por uno o más genes de glicoproteínas desplazado(s) posicionalmente por inserción, delección o transposición de uno o más polinucleótidos de desplazamiento dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo. Los polinucleótidos de desplazamiento pueden ser insertados o transpuestos en una región no codificadora (abreviadamente en lo sucesivo NCR por la expresión inglesa *non-coding region*) del genoma o antigenoma recombinante, o pueden ser incorporados en el genoma o antigenoma del RSV recombinante como una unidad génica (abreviadamente GU por la expresión inglesa *gene unit*) separada.

El RSV recombinante infeccioso y aislado puede ser construido por adición, delección o transposición de uno o más polinucleótidos de desplazamiento que pueden seleccionarse de uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma del RSV seleccionados de los genes NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F y G del RSV y segmentos de genoma y regiones delanteras, traseras e intergénicas del genoma RSV y sus segmentos. Las inserciones de polinucleótidos, y los elementos delecionados o transpuestos dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante pueden ser seleccionados de uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma del RSV bovino (BRSV) o el RSV humano (HRSV) seleccionados del (de los) gen(es) NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F y G del RSV o segmento(s) de genoma y regiones delanteras, traseras e intergénicas del genoma del RSV o sus segmentos.

Los polinucleótidos de desplazamiento pueden ser delecionados para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. La delección de un polinucleótido de desplazamiento de este modo causa un cambio o desplazamiento posicional de uno o más genes o segmentos de genoma del RSV “desplazado(s)” dentro del genoma o antigenoma re-

ES 2 317 914 T3

combinante hasta una posición más próxima al promotor con respecto a una posición del (de los) gen(es) o segmento(s) desplazado(s) del genoma dentro del genoma o antigenoma del RSV de tipo silvestre (por ejemplo, HRSV A2 o la cepa Kansas de BRSV). Polinucleótidos de desplazamiento ilustrativos que pueden ser delecionados de este modo para formar un genoma o antigenoma del RSV recombinante pueden seleccionarse de uno o más gen(es) NS1, NS2, SH, M2(ORF2) o G o sus segmento(s) de genoma.

Un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen NS1 del RSV puede estar delecionado formando el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen NS2 del RSV puede ser delecionado para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen SH del RSV puede ser delecionado para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen M2(ORF2) del RSV puede ser delecionado para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen G del RSV puede ser delecionado para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante.

Además pueden ser delecionados múltiples polinucleótidos de desplazamiento que comprenden genes o segmentos de genoma del RSV. Por ejemplo, los genes F y G del RSV pueden ser ambos delecionados para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, los genes NS1 y NS2 del RSV pueden ser ambos delecionados para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, los genes SH y NS2 del RSV pueden ser ambos delecionados para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, los genes SH, NS1 y NS2 del RSV pueden ser todos delecionados para formar el genoma o antigenoma del RSV recombinante.

Alternativamente, se describen RSV recombinantes infecciosos y aislados en donde uno o más polinucleótidos de desplazamiento son añadidos(s), sustituido(s) o transpuesto(s) dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante para causar un desplazamiento posicional de uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma desplazado(s) del genoma del RSV. Entre estas modificaciones, se pueden introducir o transponer inserciones y transposiciones de genes y segmentos de genoma, siendo los genes o segmentos de genoma objetos del desplazamiento llevados a una posición más próxima al promotor o una posición más distante del promotor con respecto a una posición respectiva de cada gen o segmento de genoma objeto (insertado o transpuesto) dentro de un genoma o antigenoma correspondiente (por ejemplo, bovino o humano) del RSV de tipo silvestre. Los polinucleótidos de desplazamiento que pueden ser añadidos, sustituidos o transpuestos dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante pueden seleccionarse de uno o más de los gen(es) NS1, NS2, SH, M2(ORF2), F y/o G o segmento(s) de genoma del RSV.

Los polinucleótidos de desplazamiento pueden seleccionarse para inserción o transposición dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante que comprende uno o más genes o segmentos de genoma del RSV que codificaban uno o más glicoproteínas o dominios inmunógenos del RSV o epítopos de glicoproteínas del RSV. Estos polinucleótidos de desplazamiento pueden seleccionarse de genes o segmentos de genoma que codifican las glicoproteínas F, G, y/o SH del RSV o dominios inmunógenos o sus epítopos. Por ejemplo, uno o más gen(es) de glicoproteínas del RSV seleccionados de F, G y SH puede(n) ser añadido(s), sustituido(s) o transpuesto(s) dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante a una posición que está más próxima al promotor o más distante al promotor comparada con la posición de orden del (de los) gen(es) de tipo silvestre.

El gen de la glicoproteína G del RSV puede ser transpuesto dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante a una posición de orden del gen que está más próxima al promotor comparada con la posición de orden del gen de G tipo silvestre. El gen de la glicoproteína G del RSV puede estar desplazado a la posición 1 de orden del gen dentro de dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante. El gen de la glicoproteína F del RSV puede estar transpuesto dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante a una posición más próxima al promotor, por ejemplo por desplazamiento del gen F a la posición 1 de orden del gen dentro del genoma o antigenoma recombinante. Alternativamente, ambos genes de las glicoproteínas G y F del RSV pueden estar transpuestos dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante a posiciones del orden de genes que están más próximas al promotor comparadas con sus respectivas posiciones de orden de genes de tipo silvestre. Por ejemplo, el gen de la glicoproteína G del RSV puede ser desplazado a la posición 1 de orden del gen y el gen la glicoproteína F puede ser desplazado a la posición 2 de orden del gen.

En otras construcciones adicionales que caracterizan los desplazamientos de genes de glicoproteínas, se producen RSV recombinantes que tienen uno o más gen(es) de glicoproteínas del RSV seleccionados de F, G y SH, o uno de sus segmentos de genoma, añadidos, sustituidos o transpuestos dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante, en donde uno o más gen(es) NS1, NS2, SH, M2(ORF2) o G o sus segmento(s) de genoma del RSV está/están delecionado(s). Por tanto, un gen F, G, o SH o segmento de genoma del RSV puede estar añadido, sustituido o transpuesto en un fondo, en donde un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen NS1 del RSV está delecionado formando el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, un gen F, G, o SH o segmento de genoma del RSV puede estar añadido, sustituido o transpuesto en un fondo, en donde un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen NS2 del RSV está delecionado formando el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Alternativamente, un gen F, G, o SH o segmento de genoma del RSV puede estar añadido, sustituido o transpuesto en un fondo, en donde un polinucleótido de desplazamiento que comprende un gen SH del RSV esta delecionado formando el genoma o antigenoma del RSV recombinante.

ES 2 317 914 T3

En un ejemplo más adelante, el gen de la glicoproteína G del RSV está transpuesto dentro de un genoma o antígenoma del RSV recombinante, que tiene una delección del gen SH, a una posición de orden del gen que está más próxima al promotor comparada con la posición de orden del gen G de tipo silvestre. En aspectos más detallados, el gen de la glicoproteína G del RSV está desplazado a la posición 1 de orden del gen dentro del genoma o antígenoma del RSV recombinante, como se ilustra con el candidato de vacuna recombinante G1/ΔSH. En otro ejemplo, el gen de la glicoproteína F está transpuesto dentro de un genoma o antígenoma del RSV recombinante, que tiene una delección del gen SH, a una posición más próxima al promotor. En aspectos más detallados, el gen F está desplazado a la posición 1 de orden del gen, como se ilustra por el recombinante F1ΔSH. En incluso otro ejemplo de más adelante, ambos genes de las glicoproteínas G y F del RSV están transpuestos dentro de un genoma o antígenoma del RSV recombinante ΔSH a posiciones de orden de genes que están más próximas al promotor comparadas con las posiciones de orden de los genes G y F de tipo silvestre. En aspectos más detallados, el gen de la glicoproteína G del RSV está desplazado a la posición 1 de orden del gen y el gen de la glicoproteína F del RSV está desplazado a la posición 1 de orden del gen dentro del genoma o antígenoma del RSV recombinante, como se ilustra por el recombinante G1F2/ΔSH.

Se proporcionan otros ejemplos adicionales del RSV con posiciones de genes desplazadas que se caracterizan por desplazamientos de gen(es) de glicoproteínas seleccionados de F, G y SH, que se producen dentro de un genoma o antígenoma del RSV recombinante que tiene múltiples genes o segmentos de genoma seleccionados del (de los) gen(es) NS1, NS2, SH, M2(ORF2) y G del RSV o segmento(s) de genoma delecionados. En un ejemplo, los genes SH y NS2 del RSV están delecionados ambos formando el genoma o antígenoma del RSV recombinante, y uno o ambos genes de las glicoproteínas G y F del RSV están transpuestos dentro del genoma del RSV recombinante a posiciones de orden de genes más próximas al promotor. En aspectos más detallados, el gen G está desplazado a la posición 1 de orden del gen y el gen F está desplazado a la posición 2 de orden del gen, como se ilustra por el recombinante G1F2/ΔNS2ΔSH. En otro ejemplo, todos los genes SH, NS1 y NS2 del RSV genes están delecionados formando el genoma o antígenoma del RSV recombinante, y uno o ambos genes las glicoproteínas G y F del RSV están transpuestos dentro del genoma o antígenoma del RSV recombinante a posiciones más próxima al promotor, como se ilustra por el candidato a vacuna recombinante G1F2/ΔNS2ΔNS2ΔSH.

En otros aspectos adicionales de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas están combinados con, o incorporados dentro de, un RSV químérico humano-bovino. Dentro de estos aspectos, el genoma o antígenoma recombinante comprende un genoma o antígenoma de fondo del RSV humano parcial o completo (HRSV) o de un RSV bovino (BRSV) combinado con uno o más gen(es) o segmento(s) heterólogos de genoma de un RSV diferente formando un genoma o antígenoma del RSV químérico humano-bovino. El gen o segmento de genoma heterólogo de los HRSV o BRSV diferentes puede estar añadido o sustituido en una posición que está más próxima al promotor o más distante al promotor comparada con la posición de orden del gen de tipo silvestre de un gen o segmento de genoma equivalente dentro del genoma o antígenoma fondo de HRSV o BRSV parcial o completo. En uno de tales ejemplos proporcionados en la presente memoria, ambos genes de las glicoproteínas G y F del RSV humano están sustituidos en las posiciones 1 y 2 de orden de genes, respectivamente reemplazando a los genes de las glicoproteínas G y F correspondientes delecionados en las posiciones 7 y 8 de tipo silvestre, respectivamente en una genoma o antígenoma de fondo del RSV bovino parcial, como se ilustra por el virus recombinante rBRSV/A2-G1F2. En otros aspectos, uno o más genes asociados a la envolvente del RSV humano seleccionados de F, G, SH y M es/están añadido(s) o sustituido(s) dentro de un genoma o antígenoma de fondo del RSV bovino parcial o completo. En aspectos más detallados, uno o más genes asociados a la envolvente del RSV humano seleccionados de F, G, SH y M es/están añadido(s) o sustituido(s) dentro de un genoma o antígenoma de fondo del RSV bovino parcial en el cual es/están delecionados uno o más genes asociados a la envolvente, seleccionados de F, G, SH y M. En un ejemplo descrito más adelante, los genes F, G, y M asociados a la envolvente del RSV humano están añadidos dentro de un genoma o antígenoma de fondo del RSV bovino parcial en el cual están delecionados todos los genes F, G, SH y M asociados a la envolvente, como se ilustra por el virus recombinante rBRSV/A2-MGF.

En otro aspecto alternativo se proporcionan RSV recombinantes infecciosos y aislados en los cuales el M2(ORF1) del RSV está desplazado a una posición más próxima al promotor dentro del genoma o antígenoma del RSV recombinante. El resultado de este desplazamiento del gen es sobre-regular la transcripción del virus recombinante.

En aspectos adicionales de esta descripción se producen RSV con posiciones de genes desplazadas y atenuadas en los cuales el genoma o antígenoma recombinante está adicionalmente modificado por introducción de una o más mutaciones atenuadoras que especifican un fenotipo atenuador en el virus o partícula subvirial resultante. Estas mutaciones atenuadoras pueden ser generadas *de novo* y analizadas en cuanto a los efectos atenuadores de acuerdo con una estrategia de diseño racional. Alternativamente, las mutaciones atenuadoras pueden ser identificadas en RSV mutantes derivados biológicamente existentes y después incorporadas en un RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención.

En combinación con los cambios posicionales de genes introducidos en los RSV recombinantes descritos en la presente memoria, frecuentemente es deseable ajustar el fenotipo de atenuación introduciendo mutaciones adicionales que aumentan o disminuyen la atenuación del virus químérico. Por tanto, las cepas candidatos para vacunas pueden estar atenuadas adicionalmente por incorporación de al menos una, y preferiblemente dos o más mutaciones atenuadoras diferentes, por ejemplo mutaciones identificadas de un panel de cepas conocidas del RSV mutantes derivadas biológicamente. Las cepas del RSV mutantes humanos preferidos son mutantes que ha sido sometidos a pasos en frío (*cp*) y/o sensibles a la temperatura (*ts*), por ejemplo los mutantes denominados "cptS RSV 248 (ATCC VR 2450), cptS RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cptS RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cptS RSV 530 (ATCC VR 2452), cptS

ES 2 317 914 T3

RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), y RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579)" (cada uno de ellos depositado de acuerdo con las normas del Tratado de Budapest en The American Type Culture Collection (ATCC) de 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., y a los que se asignaron los números de acceso antes identificados). De este panel ilustrativo de mutantes derivados biológicamente, se proporciona un gran "menú" de mutaciones atenuadoras, cada una de las cuales puede ser combinada con cualesquiera otra(s) mutación(es) dentro del panel para calibrar el nivel de atenuación en los RSV químéricos humanos-bovinos recombinantes para uso en vacunas. Pueden derivarse mutaciones adicionales a partir del RSV que tienen mutaciones atenuadoras que no son *ts* ni *cp* como se identifica, por ejemplo, en cepas mutantes de gama de hospedantes restringida (abreviadamente *hr* por la expresión inglesa *host-range restricted*), adaptadas al frío (*ca*) o de placas pequeñas (*sp*). Las mutaciones pueden ser incorporadas en secuencias antigenómicas humanas o bovinas, y las mutaciones atenuadoras identificadas en un RSV mutante humano, bovino u otro pueden ser transferidas al receptor RCV heterólogo (por ejemplo, RSV bovino o humano, respectivamente) cartografiando la mutación en el sitio homólogo correspondiente, en el genoma y receptor y mutando la secuencia natural en el receptor al genotipo mutante (ya sea por mutación idéntica o conservadora), como se describe en la solicitud de patente Provisional de EE.UU. N° 60/129.006, presentada por Murphy *et al.*, el 13 de abril de 1999.

Por tanto, se describen RSV con posiciones de genes desplazadas en donde el genoma o antigenoma recombinante incorpora al menos uno y hasta un complemento completo de mutaciones atenuadoras presentes dentro de un panel de cepas del RSV humano mutante, comprendiendo dicho panel cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), y RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579). El genoma o antigenoma recombinante puede incorporar mutaciones atenuadoras adoptadas de diferentes cepas del RSV mutante.

Los RSV con posiciones de genes desplazadas diseñados y seleccionados para uso en vacunas frecuentemente tienen al menos dos y a veces tres o más mutaciones atenuadoras para conseguir un nivel satisfactorio de atenuación para un amplio uso clínico. Por ejemplo, puede ocurrir al menos una mutación atenuadora en el gen L de polimerasa del RSV (bien sea en el gen donador o receptor) e implican uno o más sustitución(es) de nucleótidos que especifican un cambio de aminoácidos en la proteína polimerasa que especifica un fenotipo de atenuación que pueden implicar o no un fenotipo sensible a la temperatura (*ts*). Los RSV con posiciones de genes desplazadas pueden incorporar una mutación atenuadora en cualquier gen adicional del RSV además del gen L, por ejemplo, en el gen M2. Sin embargo, los RSV químéricos humano-bovino preferidos en este contexto incorporan una o más sustituciones de nucleótidos en el gen L grande de polimerasa dando como resultado un cambio de aminoácidos en los aminoácidos Asn 43, Cys 319, Phe 521, Gln 831, Met 1169, Tyr 1321 y/o His 1690 en el gen L de polimerasa del RSV, como se ilustra por los cambios, Ile por Asn 43, Leu por Phe 521, Leu por Gln 831, Val por Met 1169, y Asn por Tyr 1321. Otros cambios de aminoácidos alternativos, particularmente cambios conservadores con respecto a los residuos mutantes identificados, pueden hacerse, naturalmente, en estas posiciones para proporcionar un efecto similar como la sustitución mutante identificada. Otras mutaciones adicionales deseadas para incorporación en RSV químérico humano-bovino incluyen mutaciones atenuadoras que especifican una sustitución de aminoácidos en Val 267 en el gen N del RSV, Glu 218 y/o Thr 523 en el gen F del RSV, y una sustitución de nucleótidos en la secuencia de comienzo de gen del gen M2. Cualquier combinación de una o más mutaciones atenuadoras identificadas en la presente memoria, hasta e incluyendo un complemento completo de estas mutaciones, puede ser incorporada en el RSV químérico humano-bovino para proporcionar un virus recombinante atenuado para uso en poblaciones seleccionadas o poblaciones amplias de receptores de vacunas.

También se describen en la presente memoria, RSV con posiciones de genes desplazadas en donde el genoma o antigenoma recombinante incorpora al menos una y hasta un complemento completo de mutaciones atenuadoras que especifican una sustitución de aminoácidos en Val 267 en el gen N del RSV, Glu 218 y/o Thr 523 en el gen F del RSV, Asn 43, Cys 319, Phe 521, Gln 831, Met 1169, Tyr 1321 y/o His 1690 en el gen L de polimerasa del RSV, y una sustitución de nucleótidos en la secuencia de comienzo de gen del gen M2. En ciertos aspectos, el genoma o antigenoma recombinante incorpora al menos dos, comúnmente tres, cuatro o cinco, y a veces un complemento completo que todas estas mutaciones atenuadoras. Frecuentemente, al menos una mutación atenuadora es estabilizada por múltiples cambios de nucleótidos en un codón que especifican la mutación.

Las mutaciones atenuadoras para incorporación en RSV químéricos humano-bovinos pueden ser seleccionadas en porciones codificadoras de un gen del RSV donador o receptor o en regiones no codificadoras, tales como una secuencia reguladora cis. Las mutaciones no codificadoras ilustrativas incluyen cambios de bases sencillos o múltiples en una secuencia de comienzo de gen, como se ilustra por una sustitución de bases sencilla o múltiple en la secuencia de comienzo del gen M2 en el nucleótido 7605 (nucleótido 7606 en la secuencia recombinante).

Los RSV infecciosos como los descritos en la presente memoria pueden incorporar secuencias de nucleótidos codificadoras o no codificadoras heterólogas, de cualquier virus del RSV o similar a RSV heterólogo, por ejemplo, humano, bovino, murino (virus de neumonía de ratones), o neumovirus aviar (virus de la rinotraqueítis de pavos), o de otro virus con envolvente, por ejemplo, virus de parainfluenza (PIV). Las secuencias heterólogas ilustrativas incluyen secuencias del RSV de una cepa del RSV humano combinadas con secuencias de una cepa de un RSV humano diferente, o secuencias del RSV de una cepa del RSV humano combinada con secuencias de una cepa del RSV bovino. Los RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria pueden incorporar secuencias de dos o más cepas del RSV de tipo silvestre o mutante, por ejemplo, cepas mutantes seleccionadas de cpts RSV

248, cpts 248/404, cpts 248/955, cpts RSV 530, cpts 530/1009, o cpts 530/1030. Alternativamente, el RSV químico puede incorporar secuencias de dos o más subgrupos del RSV humano de tipo silvestre o mutante, por ejemplo una combinación de secuencias del subgrupo A y subgrupo B del RSV humano. En otros aspectos adicionales, uno o más RSV humano que codifican o no codifican polinucleótidos está/están sustituido(s) con una secuencia homóloga de un virus RS o no RSV heterólogo, solo o en combinación con una o más mutaciones atenuadoras seleccionadas, por ejemplo, mutaciones *cp* y/o *ts*, para proporcionar nuevas cepas de vacunas atenuadas.

Las mutaciones incorporadas dentro de los cDNA de los RSV con posiciones de genes desplazadas, vectores y partículas virales como se describen en la presente memoria pueden ser introducidas individualmente o en combinación en un cDNA del RSV de longitud completa, y los fenotipos de los virus rescatados que contienen las mutaciones introducidas pueden determinarse fácilmente. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos presentados por virus derivados biológicamente y atenuados frente al RSV de tipo silvestre, por ejemplo cambios exhibidos por el cpRSV o tsRSV, pueden ser incorporados en combinación dentro de un RSV con posiciones de genes desplazadas para proporcionar el nivel deseado de atenuación.

En aspectos adicionales de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas pueden denominarse fácilmente “vectores” para incorporar determinantes antigenéticos de patógenos diferentes, incluyendo más de una cepa o grupo del RSV (por ejemplo, ambos subgrupos, RSV A y RSV B humanos), virus de la parainfluenza humana (HPIV) incluyendo HPIV3, HPIV2 y HPIV1, virus del sarampión y otros patógenos (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° de serie 60/170.195; la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/458.813; y la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/459.062). El genoma o antigenoma recombinante pueden comprender un “genoma o antigenoma vector” del RSV parcial o completo combinado con uno o más genes o segmentos de genoma heterólogos que codifican uno o más determinantes antigenéticos de uno o más patógenos heterólogos. El patógeno heterólogo puede ser un RSV heterólogo (es decir, un RSV de una cepa o subgrupo diferente), y el gen o segmento de genoma heterólogo puede codificar una proteína o fragmento de la misma de NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F o G del RSV (por ejemplo, un dominio o epítopo inmunógeno). Por ejemplo, el genoma o antigenoma vector puede ser un genoma o antigenoma del RSV A parcial o completo y el (los) gen(es) heterólogo(s) o segmento(s) de genoma puede(n) codificar determinante(s) antigenético(s) de un virus del subgrupo B del RSV.

Alternativamente, el genoma o antigenoma vector del RSV con posiciones de genes desplazadas es un genoma o antigenoma de BRSV parcial o completo y el (los) gen(es) o segmento(s) de genoma heterólogos(s) que codifican el (los) determinante(s) antigenético(s) es/son de uno o más HRSV. Por ejemplo, el genoma o antigenoma de BRSV parcial o completo puede incorporar uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma que codifican uno o más genes de glicoproteínas de HRSV seleccionados de F, G y SH o uno o más segmento(s) de genoma que codifican dominios citoplásmicos, dominios transmembranales, ectodomios o porción(es) del epítopo del inmunógeno de los genes F, G, y/o SH de HRSV.

Como se ha indicado anteriormente, los RSV con posiciones de genes desplazadas diseñados como vectores para llevar determinantes antigenéticos heterólogos puede incorporar uno o más determinantes antigenéticos de un patógeno que no es RSV, tal como un virus de la parainfluenza humana (HPIV). En un ejemplo uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma de HPIV1, HPIV2, o HPIV3 que codifican una o más glicoproteína(s) HN y/o F o sus dominio(s) antigenéticos, fragmento(s) o epítopo(s) está(n) añadido(s) al, o incorporado(s) dentro del, genoma o antigenoma vector del HRSV parcial o completo. Con más detalle, una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (en lo sucesivo abreviadamente ORF por la expresión inglesa *open reading frame*) de un gen HN ó F de HPIV1, HPIV2, o HPIV3 puede estar añadido al, o incorporado dentro del, genoma o antigenoma vector recombinante.

En otros aspectos adicionales de esta descripción, el genoma o antigenoma vector comprende un genoma o antigenoma de HRSV o BRSV parcial o completo y el patógeno heterólogo se selecciona de virus del sarampión, virus sincitial respiratorio del subgrupo A y del subgrupo B, virus de paperas, virus de papilomas humanos, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 y de tipo 2, virus de herpes simplex, citomegalovirus, virus de la rabia, virus de Epstein-Barr, filovirus, bunyavirus, flavivirus, alfavirus y virus de la gripe. Basado en esta lista ilustrativa de patógenos candidatos, el (los) determinante(s) antigenéticos heterólogos pueden ser seleccionados de proteínas HA Y F del virus del sarampión, proteínas F, G, SH y M2 del virus sincitial respiratorio subgrupo A o subgrupo B, proteínas HN y F del virus de paperas, proteína L1 del virus de papiloma humano del tipo 1 o tipo 2, proteína gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana, proteínas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM del virus de herpes simplex y de citomegalovirus, proteína G del virus de la rabia, proteína gyp350 del virus de Epstein-Barr; proteína G de filovirus, proteína G bunyavirus, proteínas E y NS1 de flavivirus, y proteína E de alfavirus, y sus dominios antigenéticos, fragmentos y epítopos. El patógeno heterólogo puede ser virus del sarampión y los determinante(s) antigenéticos heterólogos pueden ser seleccionados de las proteínas HA y F del virus del sarampión y sus dominios antigenéticos, fragmentos y epítopos. Para conseguir dicha construcción química, puede ser añadida o incorporada una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HA del virus del sarampión dentro de un genoma o antigenoma vector del HRSV.

Por tanto, en la presente memoria se describen clones del RSV con posiciones de genes desplazadas, construcciones de expresión polinucleotídicas (también denominadas vectores) y partículas que pueden incorporar múltiples mutaciones específicas del fenotipo introducidas en combinaciones seleccionadas en el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas para producir un virus o partícula subviral infecciosa y atenuada. Este proceso acoplado con una evaluación fenotípica rutinaria proporciona RSV con posiciones de genes desplazadas que tienen

ES 2 317 914 T3

dichas características deseadas como atenuación, sensibilidad a la temperatura, inmunogenicidad alterada, adaptación al frío, tamaño pequeño de placas, restricción de la gama de hospedantes, etc. Las mutaciones así identificadas se compilan en un “menú” y se introducen en diversas combinaciones para calibrar un virus de vacuna hasta un nivel de atenuación, inmunogenicidad y estabilidad seleccionados.

5 En otros aspectos adicionales de esta descripción se construyen RSV con posiciones de genes desplazadas, con o sin mutaciones atenuadoras, para tener una modificación de nucleótidos que proporcionen un cambio fenotípico, estructural o funcional deseado. Típicamente la modificación de nucleótidos seleccionada especificará un cambio fenotípico, por ejemplo un cambio en las características de crecimiento, atenuación, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, tamaño de placas, restricción de la gama de hospedantes o inmunogenicidad. Los cambios estructurales en este contexto incluyen introducción o eliminación de sitios de restricción en cDNA que codifican RSV para facilidad de manipulación e identificación.

10

15 Los cambios de nucleótidos dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas pueden incluir modificación de un gen viral por delección del gen o eliminación de su expresión. Los genes diana para mutación en este contexto incluyen el de la proteína (G) de unión, el de la proteína (F) de fusión, el de la pequeña proteína hidrófoba (SH), el de la proteína (N) de unión a RNA, el de fosfoproteína (P), el de la proteína (L) polimerasa grande, el del factor de prolongación de la transcripción (M2 ORF1), el del factor regulador de RNA M2 ORF2, el de la proteína (M) de la matriz, y los de dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2. Cada una de estas proteínas pueden ser selectivamente 20 delecionadas, sustituidas o transpuestas, en todo o en parte, solas o en combinación con otras modificaciones deseadas, para conseguir nuevos recombinantes del RSV químéricos.

25 En un aspecto de esta descripción, un gen SH, NS1, NS2, G o M2-2 está modificado en el RSV con posiciones de genes desplazadas. Por ejemplo, cada uno de estos genes puede estar delecionado o su expresión eliminada (por ejemplo, por introducción de un codón de parada) para alterar el fenotipo del clón del RSV recombinante resultante para mejorar el crecimiento, la atenuación, la inmunogenicidad u otras características fenotípicas deseadas. Por ejemplo, la delección del gen SH en el genoma o antigenoma recombinante proporcionará un RSV que tiene nuevas características fenotípicas, tales como mayor crecimiento *in vitro* y/o atenuación *in vivo*. En un aspecto relacionado, una delección del gen SH, o la delección de otro gen o segmento de genoma seleccionado no esencial, tal como una delección del 30 gen NS1, NS2, G o M2-2 se construye en un RSV con posiciones de genes desplazadas, sola o en combinación con uno o más mutaciones diferentes que especifican un fenotipo atenuado, por ejemplo, una mutación puntual adoptada directamente (o en forma modificada, por ejemplo, introduciendo múltiples cambios de nucleótidos en un codón que especifica la mutación) a partir de un mutante del RSV derivado biológicamente y atenuado. Por ejemplo, el gen SH, NS1, NS2, G o M2-2 puede ser delecionado en combinación con una o más mutaciones *cp* y/o *ts* adoptadas de 35 cpts248/404, cpts530/1009, cpts530/1030 u otra cepa del RSV mutante seleccionada, para proporcionar un RSV con posiciones de genes desplazadas que tiene mayor rendimiento de virus, mayor atenuación, mayor inmunogenicidad y resistencia genética a la reversión desde un fenotipo atenuado debido a los efectos combinados de las mutaciones diferentes.

40 Las modificaciones de nucleótidos alternativas pueden incluir una delección, inserción, adición o transposición de una secuencia reguladora de acción cis para un gen seleccionado en el RSV con posiciones de genes desplazadas. En un ejemplo, una secuencia reguladora de acción cis de un gen del RSV está cambiada para corresponder a una secuencia reguladora heteróloga, que puede ser una secuencia reguladora de acción cis correspondiente del mismo gen en una secuencia reguladora de acción cis en un RSV diferente o una secuencia reguladora de acción cis de un gen 45 del RSV diferente. Por ejemplo, una señal de final de gen puede estar modificada por conversión o sustitución en una señal de final de gen de un gen diferente en la misma cepa del RSV. Alternativamente, la modificación de nucleótidos puede comprender una inserción, delección, sustitución o transposición de un sitio de comienzo de la traducción dentro del genoma o antigenoma químérico, por ejemplo, para eliminar un sitio de comienzo de la traducción alternativo para una forma seleccionada de una proteína. En un ejemplo, está eliminado el sitio de comienzo de la traducción para una 50 forma secretada de la proteína G del RSV para modificar la expresión de esta forma de proteína G y por tanto producir los efectos deseados *in vivo*.

55 Además puede producirse una variedad de otras alteraciones genéticas en un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas, solas o conjuntamente con una o más mutaciones atenuadoras adoptadas desde un RSV mutante derivado biológicamente. Por ejemplo, genes o segmentos de genoma de fuentes que no son RSV pueden estar introducidos en todo o en parte. Las secuencias de genes no traducidas pueden ser eliminadas; por ejemplo, para aumentar la capacidad de insertar secuencias extrañas. En otros aspectos adicionales, las moléculas de polinucleótido o vectores que codifican el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas pueden ser modificadas para codificar secuencias que no son del RSV, por ejemplo, una citoquina, un epítopo coadyuvante 60 de células T, un marcador de sitios de restricción, o una proteína de un patógeno microbiano (por ejemplo, virus, bacteria u hongo) capaz de desencadenar una respuesta inmune protectora en un hospedante deseado. Pueden realizarse modificaciones diferentes o adicionales en el antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas para facilitar las manipulaciones, tales como la inserción de sitios de restricción únicos en diversas regiones intergénicas (por ejemplo, un sitio *Stu*I único entre los genes G y F) o en otra parte.

65 Todas las modificaciones anteriores dentro del genoma o antigenoma RSV con posiciones de genes desplazadas, incluyendo inserciones, transposiciones, delecciones o sustituciones de nucleótidos que proporcionan mutaciones puntuales, cambios de nucleótidos específicos de sitios, y cambios que implican genes o segmentos de genoma completos,

ES 2 317 914 T3

pueden ser hechas en un genoma o antigenoma del RSV parcial o completo, o dentro de un gen donador heterólogo o segmento de genoma o receptor, genoma o antigenoma de fondo en un RSV quimérico. En cada caso, estas alteraciones especificarán preferiblemente uno o más cambio(s) fenotípico(s) en el RSV recombinante resultante, tales como un cambio fenotípico que da como resultado atenuación, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción de la gama de hospedantes, alteración en la expresión de genes, o un cambio en un epítopo inmunógeno.

En otro aspecto de esta descripción, se describen composiciones (por ejemplo, polinucleótidos aislados y vectores que incorporan un cDNA que codifica RSV) y métodos para producir RSV con posiciones de genes desplazadas 10 infecciosos y aislados. Usando estas composiciones y métodos se generan partículas o partículas subvirales del RSV con posiciones de genes desplazadas infecciosos a partir de un genoma o antigenoma del RSV recombinante co-expresado con una proteína (N) de la nucleocápsida, una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, una proteína (L) polimerasa grande, y un factor de prolongación de RNA-polimerasa. También se describen composiciones y métodos para introducir los cambios estructurales y fenotípicos en un RSV recombinante con posiciones de genes desplazadas 15 para producir virus para vacunas infecciosos y atenuados.

Se describe un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido aislada que codifica un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas. También se describe el mismo o diferente vector de expresión que comprende una o más moléculas de polinucleótidos aislados que codifican las proteínas N, P, L y factor 20 de prolongación de RNA-polimerasa. Estas proteínas también pueden ser expresadas directamente desde el cDNA del genoma o antigenoma. El (los) vector(es) es/son expresado(s) o co-expresado(s) preferiblemente en una célula o lisado exento de células, con lo cual se produce un partícula o partícula subviral del RSV con posiciones de genes desplazadas e infecciosos.

El genoma o antigenoma del RSV y los genes N, P, L y del factor de prolongación de RNA-polimerasa (preferiblemente el producto de las proteínas M2(ORF1) del RSV) pueden ser co-expresados por el mismo o diferentes vectores 25 de expresión. En algunos casos las proteínas N, P, L y el factor de prolongación de RNA-polimerasa están cada una codificadas por diferentes vectores de expresión. La molécula de polinucleótido que codifica el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas está unida operativamente a estas secuencias de control para permitir 30 la producción del virus infeccioso o partículas virales a partir del mismo. Alternativamente, el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas puede incluir secuencias de múltiples cepas o los subgrupos (A y B) del RSV humano, así como secuencias de otro RSV no humano (por ejemplo, murino). Alternativamente, el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas puede incorporar secuencias que no son del RSV, por ejemplo 35 un polinucleótido que contienen secuencias del RSV humano y bovino unidas operativamente a un nucleótido o polinucleótido que codifica una mutación puntual, una proteína, un dominio de proteína o un epítopo inmunógeno de PIV o otro virus de RNA de cadena negativa.

Los métodos y composiciones anteriores para producir RSV con posiciones de genes desplazadas proporcionan 40 partículas virales o subvirales infecciosas o sus derivados. Un virus infeccioso es comparable a una particular de virus RS auténtico y es infeccioso tal cual. Puede infectar directamente células de nueva aportación. Una partícula subviral infecciosa es típicamente un sub-componente de la partícula de virus que puede iniciar una infección en condiciones apropiadas. Por ejemplo, una nucleocápsida que contienen el RNA genómico o antigenómico y las proteínas N, P, L y M2(ORF1) es un ejemplo de una partícula subviral que puede iniciar una infección si se introduce en el citoplasma 45 de células. Las partículas subvirales descritas en la presente memoria incluyen partículas virales que carecen de una o más proteína(s), segmento(s) de proteína u otros componente(s) virales no esenciales para la infectividad.

También se describen en la presente memoria una célula o lisado exento de células que contienen un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido aislada que codifica un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas como se ha descrito antes, y un vector de expresión (el mismo o diferente 50 vector) que comprende una o más moléculas de polinucleótidos aislados que codifican las proteínas N, P, L y factor de prolongación de RNA-polimerasa del RSV. Una o más de estas proteínas también pueden ser expresadas a partir del cDNA del genoma o antigenoma. Por expresión el genoma o antigenoma y las proteínas N, P, L, y el factor de prolongación de RNA-polimerasa se combinan para producir una partícula viral o subviral del RSV infeccioso con posiciones de genes desplazadas.

El RSV con posiciones de genes desplazadas y atenuado como se describe en la presente memoria es capaz de 55 desencadenar una respuesta inmune protectora en un hospedante humano infectado, pero está suficientemente atenuado de modo que no causa síntomas inaceptables de enfermedad respiratoria grave en el hospedante inmunizado. El virus atenuado o la partícula subviral puede estar presente en el sobrenadante de un cultivo de células, aislado del cultivo, o parcial o completamente purificado. El virus también puede estar liofilizado, y puede estar combinado con una variedad de otros componentes para conservación o administración a un hospedante, según se deseé.

También se describen en la presente memoria nuevas vacunas que comprenden un vehículo y/o adyuvante fisiológicamente aceptable y un RSV con posiciones de genes desplazadas atenuado y aislado. La vacuna puede comprender 60 un RSV con posiciones de genes desplazadas que tiene al menos una, y preferiblemente dos o más mutaciones atenuadoras u otras modificaciones de nucleótidos como se ha descrito antes. La vacuna puede ser formulada en una dosis de 10^3 a 10^6 UFP de virus atenuados. La vacuna puede comprender RSV con posiciones de genes desplazadas y atenuados que desencadena una respuesta inmune contra una sola cepa del RSV o un subgrupo antigenético, por ejemplo

A ó B, o contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. A este respecto, el RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención puede desencadenar individualmente una respuesta inmune mono-específica o una respuesta inmune poli-específica contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. El RSV con posiciones de genes desplazadas puede ser combinado en formulaciones de vacuna con otros RSV que tienen diferentes características inmunógenas para una protección más eficaz contra una o múltiples cepas o subgrupos del RSV.

También se describe en la presente memoria un método para estimular el sistema inmune de un individuo para desencadenar una respuesta inmune contra una o más cepas o subgrupos del RSV en un sujeto mamífero. El método comprende administrar una formulación en una cantidad inmunológicamente suficiente del RSV con posiciones de genes desplazadas, y atenuado, en un vehículo y/o adyuvante fisiológicamente aceptable. En un método, la composición inmunógena es una vacuna constituida por RSV con posiciones de genes desplazadas que tiene al menos una, y preferiblemente dos o más mutaciones atenuadoras u otras modificaciones de nucleótido que especifican un fenotipo deseado como se ha descrito antes. La vacuna puede ser formulada en una dosis de 10^3 a 10^6 UFP de virus atenuados. La vacuna puede comprender RSV con posiciones de genes desplazadas y atenuado que desencadena una respuesta inmune contra una sola cepa o subgrupo antigenólico, por ejemplo, A o B del RSV, o contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. En este contexto, los RSV con posiciones de genes desplazadas pueden desencadenar una respuesta inmune mono-específica o una respuesta inmune poli-específica contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. Alternativamente, los RSV con posiciones de genes desplazadas que tienen diferentes características inmunógenas pueden ser combinados en una mezcla de vacunas o administrados separadamente en un protocolo de tratamiento coordinado para conferir una protección más eficaz contra una RSV cepa, o contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. Preferiblemente la composición inmunógena se administra al tracto respiratorio superior, por ejemplo, por pulverización, gotas o aerosol. Frecuentemente, la composición se administrará a un individuo seronegativo para anticuerpos contra RSV o que posea anticuerpos para RSV adquiridos a través de la placenta.

25 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras que no se refieren específicamente a la invención reivindicada se incluyen sólo por ilustración.

Figura 1. Desplazamiento del gen G o el gen F o los genes G y F juntos, a una posición próxima al promotor dentro del genoma del RSV. El diagrama en la parte superior ilustra el genoma del RSV diseñado *Blp*/ Δ SH, en el cual el gen SH ha sido delecionado como se ha descrito previamente (Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999) y un sitio de enzima de restricción *Blp*I ha sido añadido a la región no codificadora aguas arriba del gen NS1 próxima al promotor. La señal de fin de gen (abreviadamente en lo sucesivo GE por la expresión inglesa *end gene*) del gen M tiene un asterisco para indicar que contiene un solo cambio de nucleótido incorporado durante la delección del gen SH que la hace idéntica a la señal GE de SH que existe naturalmente, como se ha descrito previamente (Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999). Los dos recuadros de la parte inferior del diagrama muestran detalles de la estructura del genoma *Blp*/ Δ SH, así como las modificaciones que se hicieron en el extremo próximo al promotor (recuadro del lado izquierdo) y la región M-G-F-M2 (recuadro del lado derecho) del genoma Δ SH/*Blp* para crear los genomas G1/ Δ SH, F1/ Δ SH y G1F2/ Δ SH. Todas las manipulaciones ser realizaron con un cDNA clonado de RNA antigenómico del RSV (Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Collins *et al.*, *Virology* 259:251-255, 1999; y Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999), y las posiciones de nucleótidos están numeradas de acuerdo con la secuencia antigenómica completa del RSV recombinante de tipo silvestre (que contienen el gen SH) (Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Murphy *et al.*, Patente de EE.UU. N° 5.993.824. Adviértase que “aguas arriba” y “aguas abajo” se refieren a las direcciones próximas al promotor y distante del promotor, respectivamente (el promotor está en el extremo delantero 3' de RNA genómico de sentido negativo, que está en el extremo del lado izquierdo como aparece dibujado en la Figura 1).

Genoma *Blp*/ Δ SH: los nucleótidos 92 y 97 del mutante por delección de SH del RSV previamente descrito (Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999) fueron cambiados de G y A (indicados en el diagrama de la parte superior en el recuadro del lado izquierdo con letras minúsculas), respectivamente, a C y C (letras mayúsculas en negrita), creando con ello un sitio *Blp*I (subrayado), un nucleótido delante del codón de comienzo de la traducción ATG (en cursiva, negrita) del marco de lectura abierto (ORF) del gen NS1. La región M-G-F del genoma *Blp*/ Δ SH (recuadro del lado derecho) ilustra la delección de SH (el gen SH normalmente está entre los genes M y G).

55 Genoma G1/ Δ SH: Este genoma contiene el gen G en la posición próxima al promotor, insertado en el sitio *Blp*I (recuadro del lado izquierdo). La inserción de cDNA de G se construyó como sigue: el ORF del gen G completo y aguas abajo la secuencia no codificadora de G y la señal GE (nucleótidos 4692 a 5596) fueron manipulados para ser seguidos por una secuencia intergénica (IG) de 6 nucleótidos (que representa los primeros 6 nucleótidos de la secuencia IG de G-F que existe naturalmente, CATATT (SEQ ID NO: 1) seguido por una copia de la señal de comienzo de gen (abreviadamente a veces GS por la expresión inglesa *gene start*) de 10 nucleótidos del gen NS1 (recuadrado). Esta secuencia clonada estaba flanqueada por los sitios *Blp*I, y se clonó en el sitio *Blp*I del genoma *Blp*/ Δ SH. Esto colocó al ORF de G, bajo el control de las señales GS y GE del RSV, en la posición próxima al promotor. En el mismo genoma, el gen G estaba delecionado de su posición aguas abajo entre los genes M y F (el punto de delección está indicado con una flecha grande), y los genes M y F estaban ahora separados por la secuencia IG de G-F.

65 Genoma F1/ Δ SH: Este genoma contiene el gen F en la posición próxima al promotor, insertado en el sitio *Blp*I. La inserción del cDNA de F se construyó como sigue: el ORF del gen F completo y la secuencia no codificadora aguas abajo secuencia y la señal GE (nucleótidos 5662 a 7551) fueron manipulados para ser seguidos por una secuencia

IG de 6 nucleótidos (que representa los primeros 6 nucleótidos de la secuencia IG de F-M2 que existe naturalmente, CACAAAT (SEQ ID NO: 2) seguido por la señal GS de 10 nucleótidos del gen NS1. Esta secuencia clonada estaba flanqueada por los sitios *BpI* y se clonó en el sitio *BpI* del genoma *Bp/ΔSH*. Esto colocó al ORF del gen F, bajo el control de las señales GS y GE del RSV, en la posición próxima al promotor. En el mismo genoma, el gen F estaba 5 delecionado de su posición aguas abajo entre los genes G y M2 (el punto de la delección está indicado con una flecha grande), y estos dos genes estaban ahora separados solamente por la secuencia IG de F-M2.

Genoma GIF2/ΔSH: Este genoma contiene los genes G y F en las localizaciones primera y segunda próximas al promotor, respectivamente, insertados como un cDNA sencillo en el sitio *BpI*. Esta inserción de cDNA de G-F se 10 construyó para contener (en orden aguas arriba a aguas abajo): el ORF del gen G completo, su región no codificadora aguas abajo y la señal GE, la secuencia IG de G-F, el gen F completo, 6 nucleótidos de la secuencia IG de F-M2 (CACAAAT) (SEQ ID NO: 2), y la señal GS del gen NS1. Este cDNA estaba flanqueado por los sitios *BpI* y se clonó en el sitio *BpI* del genoma *Bp/ΔSH*. Esto colocó a los genes G y F en las posiciones 1 y 2, respectivamente, respecto 15 al promotor. En el mismo genoma, los genes G y F fueron delecionados de sus posiciones aguas abajo entre los genes M y M2 (el punto de la delección está indicado con una flecha grande), y los genes M y M2 estaban ahora separados solamente por la secuencia IG de F-M2.

Figura 2. Producción de virus recombinantes infecciosos durante la transfección y los pasos iniciales *in vitro*. 20 Células HEp-2 fueron transfectadas con el plásmido antigenómico individual indicado y los plásmidos de soporte de N, P, L y M2-1 como se describe (Murphy *et al.*, Patente de EE.UU. N° 5.993.824). Los líquidos sobrenadantes del medio se recogieron 3 días más tarde y se sometieron a pasos no diluidos en serie en células HEp-2, recogiéndose el líquido sobrenadante del medio a intervalos de 3 a 7 días. Las muestras de cada cosecha se recogieron, se congelaron 25 súbitamente, y se analizaron más tarde en paralelo por valoración de placas. A los virus se les dieron las mismas denominaciones que a sus respectivos cDNA, es decir, *Bp/ΔSH*, *G1/ΔSH* etc. Los datos se muestran para *Bp/ΔSH*, *G1/ΔSH*, *F1/ΔSH* y *G1F2/ΔSH*. La transfección se realizó a 32°C y los pasos subsiguientes a 37°C.

Figura 3A. Replicación *in vitro* del RSV recombinante wt (que contienen el gen SH), y el ΔSH (que no contiene 30 un sitio *BpI*), los virus mutantes *Bp/ΔSH*, *G1/OSH* y *G1F2/ΔSH* después de una infección a una multiplicidad de infección (abreviadamente en lo sucesivo MOI, por la expresión inglesa *multiplicity of infection*) de entrada de 0,1. Cultivos replicados de célula Vero Vero (panel superior) o células HEp-2 (panel inferior) fueron infectados e incubados 37°C. En los momentos de tiempo indicados, se cosecharon monocapas por duplicado para cada uno de los virus y los líquidos sobrenadantes del medio se congelaron súbitamente. Más tarde dichos líquidos sobrenadantes se analizaron en paralelo por valoración en placas.

Figura 3B representa el crecimiento en una sola etapa de los virus *Bp/SH*, *G1/SH*, *F1/SH* y *G1F2/SH* después 35 de una infección de monocapas de células Hep-2 (parte superior) y células Vero (parte inferior) a una multiplicidad de infección de entrada de 3,0. Monocapas de células por duplicado se infectaron e incubaron a 37°C, y en los momentos de tiempo indicados se recogieron monocapas por duplicado y los líquidos sobrenadantes del medio se congelaron súbitamente.

Figura 4. Análisis por transferencia Western de la expresión de la proteína G por los virus *Bp/ΔSH*, *G1/ΔSH* y *G1F2/ΔSH* en células Vero. Se cosecharon las células de cada momento de tiempo representadas en el panel superior 40 de la Figura 3A y las proteínas totales se analizaron por electroforesis en gel y transferencia Western. Las manchas de transferencia se desarrollaron por incubación con un antisero de conejo específico para péptidos de la proteína G. Los anticuerpos unidos se visualizaron luego por quimioluminiscencia. La proteína G emigra en dos formas: la forma madura de 90 kDa y una forma incompletamente glicosilada de 50 kDa.

Figura 5. Estructuras de los RSV atenuados en los cuales los genes G y F han sido desplazados a las posiciones 1 y 2. Panel A: Estructura del RSV recombinante *G1F2/ΔNS2ΔSH*, en el cual los genes SH y NS2 estaban delecionados 50 como se ha descrito (Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999), y los genes G y F estaban movidos a las posiciones 1 y 2, respectivamente, como se ha descrito antes en la Figura 1. Panel B: Estructura del RSV recombinante *G1 F2/ ΔNS1ANS2ΔSH*, en el cual los genes SH, NS1 y NS2 estaban delecionados y los genes G y F estaban movidos a las posiciones 1 y 2, respectivamente.

La Figura 6 detalla la construcción de un genoma rBRSV/HRSV químérico en el cual los genes G y F de BRSV 55 habían sido delecionados y los genes G y F de HRSV habían sido colocados en una posición próxima al promotor. Los genes de BRSV están sombreados; los genes de HRSV están sin sombrear. Los números de posición en la secuencia de nucleótidos son con respecto al antigenoma de rBRSV completo (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000; número de acceso a GenBank AF092942 o antigenoma de rHRSV 60 completo en Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995); los números de posición en la secuencia que se refieren a la secuencia de HRSV están subrayados. La Figura 6, panel A detalla la estructura de rBRSV que contienen los sitios *NotI*, *SalI* y *XhoI* que fueron añadidos en un trabajo previo (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000). La Figura 6, panel B representa las modificaciones en rBRSV para crear rBRSV/A2-G1 F2. Los genes G y F de BRSV estaban delecionados por digestión con *SalI* y *XhoI* 65 y religación de los extremos cohesivos compatibles resultantes. La región del genoma de HRSV desde los nucleótidos 4692 a 7557, que contiene los genes G y F, fue amplificada por PCR usando cebadores que contenían cambios deseados para ser incorporados en cada extremo del cDNA. El producto amplificado por PCR contenía (en orden aguas arriba a aguas abajo): un sitio *NotI*, un sitio *BpI*, el ORF del gen G de HRSV completo, sus regiones no codificadoras aguas

ES 2 317 914 T3

abajo y la señal GE, la secuencia IG entre los genes G-F de HRSV, el gen F de HRSV completo, 6 nucleótidos de la secuencia IG de F-M2 de HRSV (CACAAT), la señal GS del gen NS1, un sitio *BpI* o un sitio *NotI*. Este cDNA se clonó en el sitio *NotI* único en la posición 67 de rBRSV. La Figura 6, panel C ilustra la estructura del RNA genómico de rBRSV/A2-G1 F2.

5 La Figura 7 representa el crecimiento en múltiples ciclos de RBRSPV, rHRSV(rA2), rBRSV/A2, y rBRSV/A2-G1 F2 en células HEp-2 humanas (panel izquierdo) y MDBK bovinas (panel derecho). Monocapas de células por duplicado se infectaron con el virus indicado a una MOI de 0,1 y se incubaron a 37°C, y partes alícuotas del medio se recogieron en los tiempos indicados, se congelaron súbitamente, se conservaron a -70°C y se titularon más tarde por 10 duplicado. Cada valor es el título medio de dos pocillos.

15 La Figura 8 muestra la inmunofluorescencia indirecta de células HEp-2 infectadas con rBRSV/A2-G1 F2, rBRSV/A2 o rA2. Las células fueron infectadas a una MOI de 0,1, incubadas a 37°C durante 96 horas, fijadas con acetona, permeabilizadas y hechas reaccionar con anticuerpo monoclonal 021/1 G, específico para la proteína G de HRSV, 20 o con anticuerpo monoclonal 44F, específico para la proteína F de HRSV. La unión del anticuerpo se visualizó por reacción con un anticuerpo dianizado específico para IgG murino.

25 La Figura 9 detalla la construcción de un rBRSV/HRSV químérico que contiene los genes M, G y F de HRSV. Los genes de BRSV están sombreados; los genes de HRSV están sin sombrear. Los números de posición en la secuencia que se refieren a los genes de HRSV están subrayados. La Figura 9, panel A representa la modificación de rBRSV/A2 para contener un sitio *MluI* único en la posición 3204, dentro de la región intergénica entre los genes P y M (IG de P-M). Las secuencias de la IG se muestran, con letras minúsculas que indican las asignaciones de nucleótidos originales. Las letras subrayadas indican el sitio *MluI* creado por las 5 sustituciones de nucleótidos. Los números de posición en la secuencia de nucleótidos se refieren al antigenoma de rBRSV completo (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000; número de acceso a GenBank AF092942 o antigenoma de rHRSV completo en Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 11563-11567, 1995); los números de posición en la secuencia que se refieren a la secuencia de HRSV están subrayados. La Figura 9, panel B ilustra la modificación de rBRSV/A2 para crear rBRSV/A2-MGF. El fragmento *MluI-SalI* que contiene los genes M y SH de BRSV estaba escindido y reemplazado con un fragmento *MluI-SalI* que contenía el gen M de HRSV. El fragmento *MluI-SalI* que 30 contiene el gen M de HRSV se muestra en el recuadro. También se muestra la secuencia inmediatamente aguas arriba del sitio *MluI*, incluyendo la secuencia de fin del gen P de BRSV, y la secuencia inmediatamente aguas abajo del sitio *SalI*, incluyendo la región intergénica entre los genes M y G (IG de M-G), la señal de comienzo del gen G de HRSV, y el codón ATG (en negrita, y cursiva) que comienza el ORF de G. La Figura 9, panel C representa la estructura del genoma de rBRSV/A2-MGF.

35 La Figura 10 representa las estructuras de los genomas de BRSV recombinante (rBRSV, parte superior) y cinco virus BRSV/HRSV químéricos en los cuales genes específicos de BRSV (rectángulos sombreados) estaban reemplazados por sus equivalentes de HRSV (rectángulos sin sombrear). Además, en la parte inferior los genes G y F de los dos virus estaban movidos desde su posiciones normales a las posiciones 3 y 4 o 1 y 2. En el diagrama de rBRSV, se 40 indican varios sitios de restricción. Están indicados los sitios de restricción usados en las diversas construcciones. El sitio *KpnI* se presenta naturalmente y los otros fueron introducidos cuando era necesario (Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-9, 1999; Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000).

45 La Figura 11 representa el crecimiento en múltiples ciclos de los virus químéricos BRSV/HRSV, rBRSV/A2-G3F4 (panel superior) y HEp (panel inferior) comparado con los virus parentales rHRSV (rA2) rBRSV, así como con los virus químéricos rBRSV/A2-GF previamente descritos (denominados previamente rBRSV/A2; Buchholz, 2000, *supra*) y rBRSV/A2-G1F2. Cultivos en monocapas de células Vero se infectaron a una multiplicidad de infección de entrada de 0,1 y se incubaron a 37°C. En los tiempos indicados se cosecharon muestras del medio superpuesto y se determinaron los títulos de virus por el método de dilución limitante. A 0,1 ml de diluciones de 10 veces en serie por 50 pocillo, se añadieron 10⁴ células BHK-21 en un volumen de 0,1 ml. Después de 48 horas, las células se fijaron en acetona al 80%, y se realizó una valoración por inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo específico para la proteína M de BRSV, que tiene reacción cruzada con la proteína M de HRSV M, y se contaron los focos de células infectadas (véase, Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-9, 1999).

55 La Figura 12 compara el tamaño de la placa o foco formado por los virus indicados en células HEp-2 humanas (panel superior) frente a células MDBK bovinas (panel inferior), expresado como porcentaje comparado con HRSV (células HEp-2) o BRSV (células MDBK).

60 Las Figuras 13A y 13B representan las estructuras de los genomas de BRSV recombinantes en los que los genes N y/o P estaban reemplazados por sus equivalentes de HRSV. La Figura 13A muestra quimeras en las cuales estas sustituciones fueron hechas en la cadena principal del rBRSV, y la Figura 13B muestra quimeras en las cuales la cadena principal era el virus rBRSV/A2-NS1+2.

65 La Figura 14 es un diagrama del RNA genómico del virus recombinante rRSV/6120 que contiene una delección en el gen SH, dibujado como RNA de sentido negativo, 3' a 5', con cada mRNA codificado indicado con una rectángulo y regiones extragénicas e intragénicas no codificadoras de mRNA y regiones intergénicas como una línea horizontal. El cDNA antigenómico del RSV parental fue como se describió previamente (Collins, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995), con la modificación adicional de un sitio *XmaI* en la región intergénica GF (Bukreyev, *et al.*,

J. Virol., 70:6634-6641, 1996). Este cDNA estaba modificado: (i) para contener cinco sustituciones de nucleótidos tradicionalmente silenciosas en los cuatro últimos codones del ORF del gen SH incluyendo el codón de parada o detención de la traducción, y (ii) para delecionar 112 nucleótidos (posiciones 4499-4610) de la secuencia antigenómica completa de la región no traducida aguas abajo del gen SH (recuadro). Los sitios *Xba*I y *Pac*I usados en la construcción 5 están en letra cursiva y marcados, la señal de fin del gen SH está subrayada, los codones de SH se muestran como tripletes, las sustituciones de nucleótidos están en letras minúsculas, y la secuencia delecionada está representada con un recuadro con posiciones de la secuencia indicadas.

10 Las Figuras 15A-15B muestran la cinética de crecimiento de rRSV/6120, que contiene una delección en el gen SH, comparada con su rRSV recombinante de longitud completa, el D53 parental. Tres conjuntos (Figura 15A, Figura 15B y Figura 15C) de cultivos en monocapas de células HEp-2 celas se infectaron con los virus indicados a una multiplicidad infección de entrada de 0,005. Después de un periodo de adsorción, las células se incubaron a 37°C. A de intervalos 12 horas, el medio de cosechó en su totalidad y partes alícuotas se congelaron súbitamente para posterior titulación. Las células se lavaron tres veces y se añadió medio de nueva aportación y la incubación continuó. Al final 15 del experimento, las muestras se analizaron por ensayos en placas para determinar el título del virus.

Descripción detallada

20 Se describen en la presente memoria virus sincitiales respiratorios (RSV)recombinantes que están modificados por desplazamiento de un orden de gen o posición espacial de uno o más genes dentro de un genoma o antigenoma del RSV recombinante para generar un virus para vacuna que es infeccioso y atenuado en seres humanos y otros mamíferos. Típicamente el genoma o antigenoma del RSV recombinante se modifica cambiando de posición uno o más genes o genes segmentos “desplazados”, directamente o indirectamente por introducción, delección o transposición de un 25 segundo “polinucleótido de desplazamiento” dentro del genoma, dando como resultado un desplazamiento posicional del gen o segmento de genoma “desplazado” objeto a una posición más próxima al promotor o más distante del promotor. El desplazamiento de posiciones de genes o segmentos de genoma en este contexto se determina a una posición del gen o segmento de genoma objeto en un genoma o antigenoma del RSV parental antes de la introducción 30 del desplazamiento de genes, por ejemplo con respecto a la posición del gen o segmento de genoma objeto en un genoma o antigenoma RSV de tipo silvestre (por ejemplo, cepas HRSV A2 o BRSV Kansas) o en un genoma o antigenoma del RSV recombinante parental como se ha descrito en la presente memoria, antes del desplazamiento del gen.

35 En ciertos aspectos de esta descripción, el RSV con posiciones de genes desplazadas se caracteriza por uno o más genes o segmentos de genoma desplazados que están desplazados a una posición más próxima al promotor o más distante del promotor por inserción, delección o transposición de uno o más polinucleótidos de desplazamiento dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo. Los polinucleótidos de desplazamiento pueden comprender un gen o segmento de genoma del RSV, incluyendo un gen o segmento de genoma del RSV de un RSV diferente o “heterólogo” (por ejemplo, en el caso de un gen o segmento de genoma heterólogo insertado en el genoma o antigenoma de un RSV diferente). Alternativamente, los polinucleótidos de desplazamiento pueden ser 40 de una fuente que no es RSV, incluyendo de un patógeno que no es RSV, tal como virus parainfluenza (PIV) o virus del sarampión. Los polinucleótidos de desplazamiento pueden codificar una proteína o a porción de una proteína, tal como un dominio inmunógeno o epítopo de una glicoproteína, o pueden representar una secuencia incompleta o dañada, incluyendo secuencias de polinucleótidos no codificadoras y sin sentido.

45 En ciertos aspectos de esta descripción, el RSV recombinante se caracteriza por uno o más genes o segmentos de genoma posicionalmente desplazados que pueden estar desplazados a una posición más próxima al promotor o una posición más distante del promotor por inserción, delección o transposición de uno o más polinucleótidos de desplazamiento dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo. En ciertos aspectos, los polinucleótidos de desplazamiento son genes o segmentos de genomas del RSV. En otros aspectos, los polinucleótidos de 50 desplazamiento carecen de un marco de lectura abierto open (ORF) completo. Los polinucleótidos de desplazamiento pueden comprender inserciones de polinucleótidos de un tamaño entre 150 nucleótidos - (en lo sucesivo a veces se emplea la abreviatura nts para significar nucleótidos y nt para nucleótido) - y 4.000 nucleótidos de longitud. Los polinucleótidos de desplazamiento puede estar o insertados o transpuestos en una región no codificadora (NCR) del genoma o antigenoma recombinante o pueden estar incorporados en el genoma o antigenoma del RSV recombinante 55 como una unidad génica (GU) separada.

Los desplazamientos de las posiciones de los genes dentro de los RSV recombinantes descritos en la presente memoria están determinados típicamente con respecto al “promotor” del genoma o antigenoma. El promotor del RSV contiene el sitio de iniciación de polimerasa, que es un elemento de secuencia conservado reconocido por la 60 polimerasa. El promotor está situado en el extremo 3' del genoma o antigenoma, dentro de aproximadamente los treinta nucleótidos 3'-terminales. En el caso del genoma del RSV, el promotor dirige tanto la transcripción como la replicación. Sin embargo, el “promotor” del antigenoma que carezca de señales de transcripción y sólo controle naturalmente la replicación puede ser modificado para dirigir la transcripción por inserción de señales de transcripción conocidas. Para los fines de esta descripción, el promotor del RSV está construido por tanto para estar situado en el 65 extremo 3' del genoma o antigenoma, con los cual las expresiones “próxima al promotor” y “distante al promotor” usadas en la presente se refieren alternativamente o una dirección que está más cerca, o más lejos, respectivamente, del extremo 3', del genoma o antigenoma.

Por tanto se describen en la presente memoria moléculas de polinucleótidos aisladas, vectores (construcciones de expresión), y virus recombinantes que incorporan un genoma o antigenoma del RSV recombinante, en donde uno o más genes o segmentos de genes está/están desplazado(s) a una posición más próxima al promotor o a una posición más distante del promotor dentro del genoma o antigenoma recombinante comparada con la posición 5 de tipo silvestre o parental del gen en el mapa de genes del RSV. El desplazamiento de la posición de genes de este modo proporciona un aumento o disminución seleccionado en la expresión de uno o más genes “desplazado(s) posicionalmente”, dependiendo de la naturaleza y grado del desplazamiento posicional. Las glicoproteínas del RSV pueden ser sobre-reguladas por desplazamiento de uno o más genes que codifican glicoproteínas a una posición más próxima al promotor. Los genes de interés para manipulación con el fin de crear RSV con posiciones de genes desplazadas incluyen cualquiera de los genes NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F o G o un segmento 10 de genoma que puede ser parte de un gen o extragénico. Se proporcionan una variedad de mutaciones adicionales y modificaciones de nucleótidos dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas descritos en la presente memoria para proporcionar efectos fenotípicos y estructurales.

15 La construcción recombinante del RSV humano-bovino proporciona una partícula viral o una partícula subviral que es infecciosa en mamíferos, particularmente humanos, y útil para generar composiciones inmunógenas para uso clínico. También se describen en la presente memoria nuevos métodos y composiciones para diseñar y producir RSV con posiciones de genes desplazadas, y atenuado, así como métodos y composiciones para la profilaxis y tratamiento de infección por RSV. Las composiciones del RSV con posiciones de genes desplazadas e inmunógenas, tales como 20 las descritas en la presente memoria pueden desencadenar una respuesta inmune contra un subgrupo o cepa del RSV específico, o pueden desencadenar una respuesta poli-específica contra múltiples subgrupos o cepas del RSV. Los RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria son por tanto infecciosos y atenuados en seres humanos y otros mamíferos. En aspectos relacionados se describen en la presente memoria nuevos métodos para diseñar y producir RSV con posiciones de genes desplazadas, y atenuados, que son útiles en diversas composiciones 25 para generar una respuesta inmune deseada contra RSV en un hospedante susceptible de infección por RSV. Están incluidas dentro de estos aspectos de la descripción nuevas moléculas polinucleótido aisladas, vectores, y células infectas que incorporan dichas moléculas, que comprenden un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas. Los RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria pueden desencadenar una respuesta inmune contra un subgrupo o cepa del RSV específico, o una respuesta poli-específica 30 contra subgrupos o cepas del RSV múltiples. Se describen otras composiciones y métodos adicionales para diseñar y producir RSV con posiciones de genes desplazadas, y atenuados, como vectores para incorporar determinantes antigenicos de otros patógenos para generar una respuesta inmune contra diferentes patógenos de interés. También se describen en la presente memoria métodos y composiciones que incorporan RSV con posiciones de genes desplazadas para la profilaxis y tratamiento de infección y enfermedad causada por RSV y otros patógenos.

35 La presente descripción culmina y suplementa una línea continua de descubrimientos resultante del avvenimiento y refinamiento de métodos para producir RSV recombinante e infeccioso a partir cDNA. Basándose en este trabajo, ha sido posible investigar directamente las funciones de estructuras de RNA y proteínas en la expresión y replicación de genes del RSV. Estas investigaciones se describen o se informa de ellas en los siguientes documentos: solicitud 40 de patente provisional de EE.UU. Nº 60/007.083, presentada el 27 de septiembre de 1995; la solicitud de patente de EE.UU. Nº 08/720.132, presentada el 27 de septiembre de 1996; la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/021.773, presentada el 15 de julio de 1996; la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/046.141, presentada el 9 de mayo de 1997; la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/047.634, presentada el 23 de mayo de 1997; Patente de EE.UU. Nº 5.993.824, expedida el 30 de noviembre de 1999 (correspondiente a la publicación internacional 45 Nº WO 98/02530); la solicitud de patente de EE.UU. Nº 091291894, presentada por Collins *et al.*, el 13 de abril de 1999; la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/129.006, presentada por Murphy *et al.*, el 13 de abril de 1999; Crowe *et al.*, *Vaccine* 12: 691-699, 1994; y Crowe *et al.*, *Vaccine* 12: 783-790, 1994; Collins, *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 71 (8):5814-5819, 1997; Durbin *et al.*, *Virology* 235:323-332, 1997; Karron *et al.*, *J. Infect. Dis.* 176:1428-1436, 1997; He 50 *et al.*, *Virology*, 237: 249-260, 1997; Baron *et al.*, *J. Virol.*, 71:1265-1271, 1997; Whitehead *et al.*, *Virology*, 247(2):232-9, 1998a; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 72(5):4467-4471, 1998b; Jin *et al.*, *Virology*, 251:206-214, 1998; Bukreyev, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96:2367-2372, 1999; Birmingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999 Juhasz *et al.*, *Vaccine*, 17:1416-1424, 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 73:5176-5180, 1999; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-9780, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:871-877, 1999; y 55 Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; Jin, *et al.*, *Virology*, 273:210-8, 2000; Jin, *et al.*, *J. Virol.*, 74:74-82, 2000; Teng, *et al.*, *J. Virol.*, 74:9317-21, 2000).

Con respecto a los RSV con posiciones de genes desplazadas descritos en la presente memoria, cierto número de las descripciones incorporadas anteriores se han centrado en la modificación del orden de los genes naturalmente existente en los RSV. Por ejemplo, cada uno de los genes NS1, NS2, SH y G genes han sido delecionados satisfactoria e individualmente en RSV recombinantes e infecciosos, desplazando de este modo la posición de los genes aguas abajo con respecto al promotor viral. En otros recombinantes descritos en la presente memoria, los genes NS1 y NS2 fueron delecionados conjuntamente, desplazando los genes remanentes en posición próxima al promotor dentro del genoma o antigenoma del RSV recombinante. Por ejemplo, cuando se delecionan los genes NS1 y NS2 conjuntamente, N se mueve desde la posición 3 a la posición 1, P desde la posición 4 a la posición 2, y así sucesivamente. La delección de cualquier otro gen del RSV dentro de realizaciones alternativas de la invención desplazará similarmente la posición (respecto al promotor) de aquellos genes que están localizados más aguas abajo. Por ejemplo, SH ocupa la posición 6 en el virus de tipo silvestre, y su delección no afecta a M en la posición 5 (o cualquier otro gen situado aguas

ES 2 317 914 T3

arriba) pero mueve G desde la posición 7 a la 6 respecto al promotor. Debe advertirse que la delección de genes también ocurrir (aunque raramente) en un virus mutante derivado biológicamente (Karron *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13961-13966, 1997). Adviértase que “aguas arriba” y “aguas abajo” se refieren a las direcciones próxima al promotor y distante del promotor, respectivamente (el promotor está en el extremo delantero 3’ de RNA genómico de sentido negativo).

Las modificaciones por desplazamiento del orden de los genes (es decir, modificaciones de posición que mueven uno o más genes a una localización más próxima al promotor o más distante del promotor en el genoma viral recombinante) en RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria dan como resultado virus con propiedades biológicas alteradas. Por ejemplo, los RSV que carecen de los genes NS1, NS2, SH, G, NS1 y NS2 conjuntamente, o los genes SH y G conjuntamente, han demostrado estar atenuados *in vitro*, *in vivo*, o en ambos. Es probable que este fenotipo fuera debido principalmente a la pérdida de la expresión de la proteína viral específica. Sin embargo, el mapa de genes alterado también contribuyó probablemente al fenotipo observado. Este efecto está bien ilustrado por el virus con delección del gen SH, que creció más eficazmente que el de tipo silvestre en algunos tipos de células, debido probablemente a un aumento en la eficacia de la transcripción, replicación o ambas resultante de la delección de genes y el cambio resultante en el orden de los genes y posiblemente en el tamaño del genoma. En otros virus, tales como RSV en los cuales estaban delecionados los genes NS1 y/o NS2, el crecimiento alterado que podía haber habido ocurrido debido al cambio en el orden de los genes probablemente fue oscurecido por el fenotipo más dominante debido a la pérdida de expresión de las proteína(s) del RSV.

Otros cambios adicionales han sido introducidos satisfactoriamente para cambiar el orden de genes del RSV para mejorar sus propiedades como una vacuna atenuada viva. En ejemplos específicos que demuestran la eficacia de la invención, los genes G y F del RSV fueron desplazados, solos y en tandem, a una posición más próxima al promotor con respecto a su orden de genes de tipo silvestre. Estas dos proteínas normalmente ocupan las posiciones 7 (G) y 8 (F) en el orden de genes del RSV (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L). Para aumentar la posibilidad de recuperación útil, estas manipulaciones de las posiciones de los genes G y F se realizaron en una versión del RSV en la cual el gen SH había sido delecionado (véase, por ejemplo, Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-42 (1999)). Esto facilita la recuperación viral, porque este virus produce placas más grandes *in vitro* (Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-82, 1997). Los genes G y F fueron movidos luego individualmente a la posición 1, o fueron movidos conjuntamente a las posiciones 1 y 2, respectivamente.

Sorprendentemente, fueron recuperados fácilmente RSV recombinantes en los cuales G o F estaban movidos a la posición 1, o en los cuales los genes G y F estaban movidos a las posiciones 1 y 2, respectivamente. Este resultado difería grandemente, de los estudios previamente publicados, con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), en donde el movimiento de un solo gen de glicoproteínas del VSV en solo dos posiciones fue muy perjudicial para el crecimiento del virus (Ball *et al.*, *J. Virol.*, 73:4705-4712, 1999). La capacidad de recuperar estos virus alterados también fue sorprendente porque el RSV se replica ineficazmente y porque el RSV tiene un orden complejo de genes y el movimiento de genes de glicoproteínas implicó un gran número cambios de posición. Realmente, los RSV transpuestos crecieron al menos también como sus parentales inmediatos que tienen el orden de genes de tipo silvestre. Como se indicó anteriormente, esto es particularmente importante para el RSV, puesto que el virus de tipo silvestre crece ineficazmente en cultivos de células y una reducción adicional en la replicación *in vitro* probablemente haría que no fuera factible la preparación de vacuna. Por tanto, es notable que todos los genes de las proteínas NS1-NS2-N-P-M pudieran ser desplazados en una o dos posiciones respecto al promotor sin una disminución en la aptitud para el crecimiento. Además, el examen de la expresión de la glicoproteína G mostró que estaba aumentada en varias veces la expresión de su virus parental. Esto indicó que un virus para vacuna que contiene el gen G y/o F en la primera posición expresa una alta cantidad molar de estos antígenos protectores comparada con las otras proteínas virales, y por tanto representa un virus con propiedades para vacuna deseadas.

También se consiguieron modificaciones similarmente extensas en el orden de los genes con dos candidatos para vacunas del RSV altamente atenuados en los cuales el gen NS2 estaba delecionado solo, o en los cuales los genes NS1 y NS2 estaban delecionados juntos, como se ha descrito con más detalle en las referencias antes incorporadas. En estos dos candidatos para vacuna, los genes de las glicoproteínas G y F estaban movidos conjuntamente a las posiciones 1 y 2 respectivamente, y los genes de las glicoproteínas G, F y SH estaban delecionados de su posición original aguas abajo. Por tanto, los virus recuperados G1F2 Δ NS2 Δ SH y G1F2 Δ NS1 Δ NS2 Δ SH tenían dos y tres genes delecionados respectivamente además del desplazamiento de los genes G y F. Para ilustrar la extensión de los cambios implicados, pueden compararse el orden de los genes en el RSV de tipo silvestre (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L) y en el virus G1F2 Δ NS2 Δ SH (G-F-NS1-N-P-M-M2-L) o el virus Δ NS1 Δ NS2 Δ SH (G-F-N-P-M-M2-L). Esto muestra que estaban cambiadas las posiciones de la mayoría o la totalidad de los genes respecto al promotor. Sin embargo, los derivados altamente atenuados retenían la capacidad de crecer en cultivos de células.

Otros cambios adicionales han sido introducidos satisfactoriamente para cambiar el orden de los genes del RSV en un RSV químérico humano-bovino para mejoras sus propiedades de vacuna atenuada viva (véase, la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 09/602.212, presentada por Bucholz *et al.* 23 de junio de 2000, su correspondiente solicitud PCT publicada como WO 01/04335 el 18 de enero de 2001, y su solicitud prioritaria provisional de EE.UU. N° 60/143.132 presentada el 9 de julio de 1999). Como se ilustra en los ejemplos más adelante, se construyó satisfactoriamente y se recuperó un RSV químérico humano-bovino, recombinante e infeccioso (rBRSV /HRSV) en el cual los genes G y F de HRSV están sustituidos en un fondo del RSV bovino recombinante (rBRSV). La quimera humano-bovina resultante contenía dos genes de HRSV, a saber: G y F, y ocho genes de BRSV, a saber: NS1, NS2, N, P, M,

SH, M2 y L. Además de esta construcción de glicoproteína sustituida básica, los genes G y F del HRSV están desplazados a una posición más próxima al promotor en la cadena principal del rBRSV, es decir, con respecto a la posición de orden de los genes F y G de tipo silvestre en el genoma del RSV. Más específicamente, los genes F y G estaban movidos desde su localización usual respecto al promotor, es decir, las posiciones 7 y 8 de genes, respectivamente, a 5 las posiciones 1 y 2, respectivamente. El virus recombinante químérico resultante, rBRSV/A2-G1F2, es muy similar 10 en sus niveles de expresión de las proteínas F y G como se detectó por inmunofluorescencia a los de HRSV wt, cuyo resultado es interpretado mostrando mayor expresión de las glicoproteínas G y F atribuida al desplazamiento próximo al promotor de los genes. Puesto que el presente virus rBRSV/A2-G1F2 lleva la misma dotación de genes de BRSV 15 en su fondo genético, es probable que comparten su fuerte fenotipo de restricción de la gama de hospedantes. En este contexto, la mayor expresión de los dos antígenos protectores *in vivo* aumentará la inmunogenicidad de este virus para producir propiedades de vacuna altamente deseables.

El RSV es virus de RNA de cadena negativa no segmentado del Orden *Mononegavirales*. Los mononegavirus 15 constituyen un Orden grande y diversos que incluye cuatro familias: la Familia *Rhabdoviridae*, representada por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la rabia; la Familia *Bornaviridae*, representada por el virus de la enfermedad *borna*; la Familia *Filoviridae*, representada por los virus Marburg y Ebola, y la Familia *Paramyxoviridae*. Esta última familia se divide además en dos subfamilias: *Paramyxovirinae*, que incluye el virus Sendai, los virus del sarampión, de las paperas y de la parainfluenza, y *Pneumovirinae*, que incluye el virus respiratorio sincitial.

20 El genoma de un mononegavirus es una sola cadena de RNA que contiene de 5 (VSV) a 11 (RSV) genes dispuestos en un patrón lineal. El genoma de los mononegavirus no codifica proteínas directamente (de ahí la denominación cadena de “sentido negativo”), sino que codifica mRNA de sentido positivo complementario, que cada uno codifica una o más proteínas. Típicamente, un gen comienza con una corta señal de comienzo de gen y termina con una corta 25 señal de fin de gen. Estas señales usualmente consisten en 8 a 12 nucleótidos y usualmente están altamente conservadas entre genes de un virus dado y en menos extensión entre virus relacionados.

En el caso del RSV, el genoma tiene una longitud de más de 15,2 kb y es transcrita en 10 mRNA principales separados que codifican 11 proteínas identificadas. Específicamente el orden de los genes del RSV es 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', y el mRNA de M2 codifica dos proteínas, M2-1 y M2-2 de los dos ORF solapantes. Las 30 señales de comienzo de gen y de final de gen del RSV, junto con las secuencias implicadas en la replicación de RNA y en la función del promotor también han sido identificados y analizadas en trabajo en curso (Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-6641, 1996; Collins, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9663-9667, 1991; Mink *et al.*, *Virology* 185:615-624, 1991; Grosfeld *et al.*, *J. Virol.*, 69:5677-5686, 1995; Hardy y Wertz, *J. Virol.*, 72:520-526, 1998; Hardy *et al.*, *J. Virol.*, 73:170-176, 1999; Kuo *et al.*, *J. Virol.*, 70:6143-6150, 1996; Kuo *et al.*, *J. Virol.*, 70:6892-6901, 1996; Samal 35 y Collins, *J. Virol.*, 70:5075-5082, 1996; Kuo *et al.*, *J. Virol.*, 71:4944-4953, 1997; Farnes y Collins, *J. Virol.*, 73:388-397, 1999).

El extremo 3' de un genoma de mononegavirus contiene un promotor que dirige la entrada de la polimerasa (Lamb y Kolakofsky, *Fields Virology*, 1:1177-1204, 1996; y Wagner y Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996). Este 40 promotor está contenido completamente o en parte en una región delantera extragénica en el extremo 3' del genoma. La polimerasa transcribe luego el genoma 3'-a-5' de una manera, parada-vuelta a comenzar guiada por las señales de comienzo de gen y de fin de gen. La señal de comienzo de gen de cada gen dirige la iniciación de la síntesis del mRNA correspondiente y la señal de fin de gen dirige la poliadenilación, la terminación y la liberación del mRNA correspondiente. La polimerasa permanece luego unida al molde y reinicia su acción en la señal de comienzo de gen aguas abajo. Este proceso, se repite para transcribir un gen tras otro en su orden 3'-a-5' (Lamb y Kolakofsky, *Fields Virology*, 1:1177-1204, 1996; Wagner y Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Abraham y Banerjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1504-1508, 1976; Ball y White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:442-446, 1976; Ball, *J. Virol.*, 21:411-414, 1977; Banerjee *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 34: 1-8, 1977; Iverson y Rose, *Cell*, 23:477-484, 1981; Iverson y Rose, *J. Virol.*, 44:356-365, 1982; Banerjee *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 51:47-70, 1991).

50 Cuatro de las proteínas del RSV enumeradas anteriormente son proteínas de la nucleocápsida/polimerasas, a saber la proteína N principal de nucleocápsida, la fosfoproteína P, y la proteína polimerasa L, y la proteína anti-terminación de la transcripción M2-1. Tres son glicoproteínas de superficie, a saber: la proteína G de unión, la glicoproteína F de fusión responsable de la penetración y formación de sincitios, y la pequeña proteína hidrófoba SH de función desconocida. La proteína de la matriz M es una proteína del virión interno implicada en la formación viriones. Hay dos proteínas no estructurales NS1 y NS2 de función desconocida. Finalmente, hay un segundo marco de lectura abierto (ORF) en el mRNA de M2 que codifica un factor regulador de RNA el M2-2.

Las proteínas G y F son los principales antígenos de neutralización y protectores (Collins, *et al.*, *Fields Virology* 60 2:1313-1352, 1996; Connors, *et al.*, *J. Virol.*, 66:1277-81, 1992). La resistencia a la re-infección por RSV está mediada principalmente por anticuerpos serológicos y mucosales específicos contra estas proteínas. La células T citotóxicas específicas también son inducidas por infección por RSV y pueden ser dirigidas contra un número de proteínas diferentes, pero este efecto no ha demostrado ser un agente contribuyente importante a la resistencia a largo plazo a la re-infección. Sin embargo, ambas células CD8+ y CD4+ pueden ser importantes en regular la respuesta inmune, y 65 ambas pueden estar implicadas en la patogénesis viral (Johnson, *et al.*, *J. Virol.*, 72:2871-80, 1998; Srikiatkachorn y Braciale, *J. Exp. Med.* 186:421-32, 1997). Por tanto, las proteínas F y G son los determinantes antigenicos más importantes, pero otras proteínas también pueden desempeñar papeles importantes en la respuesta inmune.

Los aislados del RSV pueden segregarse en dos subgrupos antigenicos, A y B, por su reactividad con anticuerpos monoclonales (Anderson, *et al.*, *J. Infect. Dis.* 151:626-33, 1985, Mufson, *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 66:2111-24, 1985). Los dos subgrupos exhiben diferencias a través del genoma, pero son más divergentes en el ectodominio de la proteína G en donde la divergencia en la secuencia porcentual de aminoácidos puede ser superior al 50% y la divergencia antigenica es 95% basada la reactividad de antisueros policlonales mono-específicos (Johnson, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5625-9, 1987; Johnson, *et al.*, *J. Virol.*, 61:3163-6, 1987). La proteína F es aproximadamente 10% divergente en secuencia de aminoácidos y 50% divergente antigenicamente entre los subgrupos A y B del RSV (Johnson, *et al.*, *J. Virol.*, 61:3163-6, 1987; Johnson y Collins, *J. Gen. Virol.*, 69: 2623-8, 1988). Por tanto, ambos subgrupos deben estar representados en una vacuna.

De los RSV y otros mononegaviruses se ha descrito que exhiben un gradiente de transcripción de genes decreciente, de tal modo que el gen más próximo al promotor se transcribe más eficazmente, y cada gen sucesivo presenta una eficacia de transcripción incrementalmente decreciente (Lamb y Kolakofsky, *Fields Virology*, 1:1177-1204, 1996; Wagner y Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Abraham y Banerjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1504-1508, 1976; Ball y White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:442-446, 1976; Ball, *J. Virol.*, 21:411-414, 1977; Banerjee *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 34:1-8, 1977; Iverson y Rose, *Cell*, 23:477-484, 1981; Iverson y Rose, *J. Virol.*, 44:356-365, 1982; Banerjee *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 51:47-70, 1991). Este gradiente de la expresión de genes se ha descrito y caracterizado parcialmente para RSV (Collins y Wertz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3208-3212, 1983; Collins *et al.*, *J. Virol.*, 49:572-578, 1984; Dickens *et al.*, *J. Virol.*, 52:364-369, 1984). Este gradiente se cree que es parcialmente atribuido al decaimiento ("fall-off") de la polimerasa durante la transcripción secuencial. Los estudios con el rhabdovirus VSV, uno de los mononegaviruses más sencillos, sugiere que el "decaimiento" ocurre principalmente en las regiones intergénicas (Iverson y Rose, *Cell*, 23:477-484, 1981; Iverson y Rose, *J. Virol.*, 44:356-365, 1982), aunque la abundancia desproporcionadamente baja de mRNA de L grande sugiere que hay también un "decaimiento" significativo dentro de los genes.

El gradiente de la transcripción genes descrito para los mononegaviruses se cree que es un factor importante que determina las relaciones molares relativas de los diversos mRNA virales dentro de una célula infectada. Este fenómeno a su vez se piensa que es un factor importante que determina las relaciones molares relativas de las proteínas virales. Todos los mononegaviruses tienen genes que codifican las siguientes cinco proteínas o sus homólogas: una proteína N de la nucleocápsida que se une al RNA, a fosfoproteína P, una proteína M de la matriz interna del virión, una proteína G, HA, o HN de unión, y una proteína L polimerasa grande. Además, estos genes siempre se encuentran en el orden 3'-a-5' N-P-M-G-L. Una interpretación es que esta organización genómica refleja una necesidad común entre los mononegaviruses de grandes cantidades de las proteínas N y P, una pequeña cantidad de L, y cantidades intermedias de M y G. Alternativamente, se ha sugerido que la falta de recombinación homóloga en mononegaviruses ha dado como resultado la retención de un orden ancestral de genes que necesariamente no es el óptimo para los virus (Ball *et al.*, *J. Virol.*, 73:4705-4712, 1999).

El orden restringido de los genes y la naturaleza polar de la transcripción han sido propuestos como un factor importante en la regulación de la expresión génica entre los mononegaviruses. Sin embargo, también se cree que otros factores secundarios también afectan a los niveles relativos de expresión de uno o más de los genes de las proteínas mononegavirales, incluyendo diferencias en eficacias de las señales de RNA de acción cis, diferencias en eficacias de traducción de diversos mRNA, y diferencias en el procesamiento y estabilidad de las proteínas.

El mononegavirus prototípico sencillo, el VSV, tiene 5 genes (Wagner y Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Schubert *et al.*, *J. Virol.*, 51:505-514, 1984). Sin embargo, otros mononegaviruses tienen tanto como 11 genes (RSV) o 12 (virus de la neumonía de ratones) (Barr *et al.*, *J. Virol.*, 68:5330-5334, 1994). Estos incluyen proteínas, tales como el gen de fusión F encontrado en todos los paramixovirus y neumovirus, los genes C, D y V encontrados en algunos paramixovirus, y los genes NS1, NS2, SH y M2 encontrados en la mayoría de los neumovirus. También, incluso entre las cinco proteínas que pueden ser comunes al VSV y al RSV (N, P, M, G y L), existe una clara relación de secuencia solamente para L, y que la relación es baja (Poch *et al.*, *Embo. J.* 8:3867-3674, 1989; Stec *et al.*, *Virology*, 183:273-287, 1991).

Dada esta extensiva diferencia en el patrón y estructura de los productos génicos, consideradas con las diferencias en la estructura y función de los componentes de acción trans- y cis-, las características y propiedades de un mononegavirus, por ejemplo, VSV, no pueden ser directamente extrapoladas a otros mononegaviruses, tales como RSV. Esta incertidumbre se ilustra por el hallazgo de que la RSV polimerasa consiste en 4 en lugar de 3 proteínas, siendo la adicional el factor de anti-terminación M2-1 que no tiene equivalente en VSV (Hardy y Wertz, *J. Virol.*, 72:520-526, 1998; Hardy *et al.*, *J. Virol.*, 73:170-176, 1999; Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:81-85, 1996; Fearns y Collins, *J. Virol.*, 73:5852-5864, 1999). Esto probó ser un aspecto crítico para la recuperación eficaz del RSV recombinante (Collins *et al.*, *Virology* 259:251-255, 1999). Además la síntesis de RNA del RSV está adicionalmente regulada por al menos dos proteínas, NS1 y M2-2, que no tienen equivalentes en VSV (Birmingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-64, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; Atreya *et al.*, *J. Virol.*, 72:1452-61, 1998; Jin *et al.*, *J. Virol.*, 74:74-82, 2000).

Un número de características importantes de la expresión y regulación de los genes de VSV tampoco parece tener ninguna relevancia también en muchos otros mononegaviruses y en particular en RSV, tales como la implicación de la complementariedad terminal en el control de expresión de los genes VSV (Wertz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:8587-8591, 1994; Whelan y Wertz, *J. Virol.*, 73: 297-306, 1999; Peebles y Collins, *J. Virol.*, 74:146-155, 2000), las

regiones intergénicas de VSV altamente conservadas que están directamente implicadas en la expresión de genes (Barr *et al.*, *J. Virol.*, 71:1794-1801, 1997) mientras que las del RSV no lo están (Kuo *et al.*, *J. Virol.*, 70:6143-6150, 1996; incorporada en la presente memoria como referencia), una señal de empaquetamiento genómico de VSV (Whelan y Wertz, *J. Virol.*, 73:307-315, 1999) no encontrado en otros grupos de mononegavirus, y un control de la expresión

- 5 y replicación de los VSV genes por la proteína N (Wagner y Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Fearns *et al.*, *Virology* 236:188-201, 1997). Estas características no parecen estar presentes en el RSV (Peeples y Collins, *J. Virol.*, 74:146-155, 2000), aunque en contraste el RSV tiene características importantes de expresión y regulación de genes que no ocurren en el VSV, incluyendo secuencias intergénicas divergentes que carecen de elementos funcionales de acción cis (Kuo *et al.*, *J. Virol.*, 70:6143-6150, 1996), un solapamiento de genes que media la atenuación específica de sitio (Fearns y Collins, *J. Virol.*, 73:388-397, 1999; Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5134-5138, 1987), y la existencia de un mecanismo de retro-seguimiento de polimerasa crítico para la expresión del gen L (Fearns y Collins, *J. Virol.*, 73:388-397, 1999). En particular, la existencia de un factor anti-terminación de la transcripción que modula la transcripción secuencial (Fearns y Collins, *J. Virol.*, 73:5852-5864, 1999), proteínas reguladoras específicas, atenuación específica de sitio, y modulación de la transcripción específica de la unión o empalme de genes (Hardy *et al.*, *J. Virol.*, 73:170-176, 1999) contrastan marcadamente con la situación con VSV.

En ciertos aspectos de esta descripción, los desplazamientos de las posiciones de los genes se consiguen por delección de uno o más de los genes NS1, NS2, SH y/o G del RSV, las cuales delecciones se describen individualmente en las referencias antes incorporadas. Pueden construirse delecciones alternativas de genes o segmentos de genoma que implican cualquiera de los genes o segmentos de genomas del RSV antes identificados, para alterar la posición de los genes del RSV restantes. Pueden ser delecionados múltiples genes o segmentos de genoma, como se ilustra en las referencias antes incorporadas por delección a pares de los genes NS1 y NS2 (Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999).

25 La delección de uno o más genes o segmentos de genoma dentro de un genoma o antigenoma del RSV recombinante tiene el efecto de mover todos los genes situados aguas abajo más próximos al promotor (por ejemplo, desplazando los genes situados aguas abajo genes una o más posiciones de genes en una dirección próxima al promotor). Por ejemplo, los genes NS1 y NS2 del RSV son los genes primero y segundo en el mapa del genoma mapa, y su delección coordinada altera la posición de todos los genes restantes. Por tanto, cuando los genes NS1 y NS2 son delecionados conjuntamente, N es movido desde la posición 3 a la posición 1, P desde la posición 4 a la posición 2, y así sucesivamente. Alternativamente, la delección de cualquier otro gen dentro del orden de genes afectará a la posición (respecto al promotor) solamente de aquellos genes que estén localizados incluso más aguas abajo. Por ejemplo, SH ocupa la posición 6 en virus de tipo silvestre, y su delección no afecta a M en la posición 5 (o cualquier otro gen situado aguas arriba) pero mueve a G desde la posición 7 a la 6 respecto al promotor. Debe advertirse que la delección de genes también puede ocurrir (raras veces) en virus derivados biológicamente. Por ejemplo, un RSV del subgrupo B que había sido sometidos a pasos extensivamente en cultivo de células delecionó espontáneamente los genes SH y G (Karron *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13961-13966, 1997). Adviéntase que "aguas arriba" y "aguas abajo" se refieren a las direcciones próximas al promotor y distante al promotor, respectivamente (el promotor está en el extremo delantero 3' del RNA genómico de sentido negativo).

40 Un segundo ejemplo de una transposición útil del orden de los genes implica la inserción de un gen, segmento de genoma o secuencia de polinucleótido heterólogo en el genoma o antigenoma del RSV recombinante para alterar el orden del gen o introducir un desplazamiento de genes respecto al promotor en el genoma o antigenoma recombinante (véase, por ejemplo, Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-6641, 1996; Bukreyev *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2367-2372, 1999; Moriya *et al.*, *FEBS Lett.* 425:105-111, 1998; Singh y Billeter, *J. Gen. Virol.*, 80:101-106, 1999). Cada gen insertado desplaza todos los genes situados aguas abajo en una posición respecto al promotor. Estos y otros polinucleótidos de desplazamientos pueden ser insertados o transpuestos en una región no codificadora (NCR) del genoma o antigenoma recombinante, o pueden ser incorporados en el genoma o antigenoma del RSV recombinante en forma de una unidad génica (GU) separada.

50 Como se usa en la presente, "gen del RSV" generalmente se refiere a una porción del genoma del RSV que codifica un mRNA y típicamente comienza en el extremo aguas arriba con la señal de comienzo de gen (GS) de 10 nucleótidos y termina en el extremo aguas abajo con la señal de fin de gen (GE) de 12 a 13 nucleótidos. Se conocen diez de tales genes para uso dentro de la invención para el RSV, a saber: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 y L. El término "gen" también se usa en la presente memoria para referirse a un "marco de lectura abierto traduccional" (ORF). El ORF se define más específicamente como un marco de lectura abierto traduccional que codifica proteínas del RSV significativas, de los cuales 11 son reconocidas corrientemente: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1 (alternativamente, M2(ORF1)), M2-2 (alternativamente, M2(ORF2)), y L. Por tanto, el término "gen" se refiere intercambiablemente a una secuencia de RNA genómico que codifica una secuencia de RNA subgenómico, y un ORF (el último término se aplica particularmente en una situación, tal como en el caso del gen M2 del RSV, en donde un solo mRNA contiene dos ORF solapantes que codifican proteínas distintas). Collins *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 71:3015-3020, 1990; Birmingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999; Ahmadian *et al.*, *EMBO J.* 19: 2681-2689, 2000; Jin *et al.*, *J. Virol.*, 74:74-82, 2000 (Cuando el término "gen" se usa en el contexto de determinar la posición de genes respecto a una posición de promotor, el término se refiere ordinariamente de un modo estricto a una secuencia que codifica mRNA limitada por restos de una señal de comienzo de gen en transcripción y una señal de fin de gen (Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4594-4598, 1986; Kuo *et al.*, *J. Virol.*, 70:6892-6901, 1996).

ES 2 317 914 T3

Por “segmento de genoma” se quiere decir cualquier longitud de nucleótidos continuos del genoma de los RSV, que puede ser parte de un ORF, un gen, o una región extragénica, o una de sus combinaciones.

Los genes y segmentos de genoma que pueden ser seleccionados para uso como inserciones, sustituciones, elementos delecionados, o elementos transpuestos dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria incluyen genes o segmentos de genoma que codifican una proteína NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F o G o una de sus porciones. También pueden considerarse las regiones reguladoras, tales como las regiones delanteras o traseras extragénicas. En aspectos preferidos de esta descripción, un RSV químico incorpora uno o más gen(es) heterólogo(s) que codifica una glicoproteína F, G o SH del RSV. Alternativamente, el RSV recombinante puede incorporar un segmento de genoma que codifica un dominio citoplásmico, dominio transmembranal, ectodomínio o epítopo inmunógeno de una glicoproteína F, G o SH del RSV. Estas proteínas, dominios y epítopos inmunógenos son particularmente útiles dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas debido a que generan nuevas respuestas inmunes en un hospedante inmunizado. En particular, las proteínas G y F, y sus dominios y epítopos inmunógenos, proporciona los principales antígenos de neutralización y protectores. Además los genes y segmentos de genoma que codifican proteínas que no son del RSV, por ejemplo, una proteína SH como se encuentra en el virus de las paperas y el virus SV5, puede ser incorporada dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención. La regiones reguladoras, tales como las regiones delantera 3' o trasera 5', y de comienzo de gen, y de fin de gen extragénicas, las regiones intergénicas, o las regiones 3' o 5' no codificadoras, son también útiles como sustituciones o adiciones heterólogas (que se originan a partir de una cepa o subgrupo del RSV diferente o de una fuente que no es un RSV, tales como PIV, virus del sarampión, virus de las paperas etc.).

Por ejemplo, la adición o sustitución de uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma inmunógeno(s) a partir de un subgrupo o cepa del RSV humano o dentro de genoma o antigenoma receptor bovino proporciona un virus o partícula subviral recombinante químico capaz de generar una respuesta inmune dirigida contra el virus donante humano, incluyendo uno o más subgrupos o cepas del RSV humano específico, mientras que la cadena principal bovina confiere un fenotipo atenuado que hace a la quimera un candidato útil para el desarrollo de vacunas. Por ejemplo, uno o más genes de las glicoproteínas F, SH, y/o G del RSV humano se añaden a, o son sustituidos dentro de, un genoma o antigenoma bovino parcial o completo para proporcionar una quimera humano-bovino infecciosa y atenuada, que desencadena una respuesta inmune anti-RSV humano en un hospedante susceptible. Para otro ejemplo, los RSV con posiciones de genes desplazadas incorporan un gen o segmento de genoma heterólogo que codifica una proteína dominio de proteína o epítopo inmunógeno a partir de múltiples cepas del RSV humano, por ejemplo dos proteínas F o G o sus porciones inmunógenas de ambos subgrupos A y B del RSV. Alternativamente, un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas codifica una glicoproteína química en virus o partícula subviral recombinante que tiene ambos dominios o epítopos inmunógenos humanos y bovino. Por ejemplo, un segmento de genoma heterólogo que codifica una ectodomínio de glicoproteína de las glicoproteínas F, SH o G del RSV humano puede ser unido con un segmento de genoma que codifica dominios citoplásmicos y endodomínios de las glicoproteínas F, SH o G en el del genoma o antigenoma bovino de fondo.

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, el RSV químico humano-bovino puede ser construido sustituyendo el gen o segmento de genoma equivalente por un gen o segmento de genoma heterólogo en un genoma o antigenoma de fondo del RSV parcial. Alternativamente, puede ser añadido el gen o segmento de genoma heterólogo como un gen o segmento de genoma supernumerario en combinación con un fondo genoma o antigenoma del RSV completo (o parcial si es delecionado otro gen o segmento de genoma). Por ejemplo, pueden ser incluidos dos genes G o F o segmentos de genoma del RSV humano, uno de cada de los subgrupos A y B del RSV.

Frecuentemente, los genes o segmentos de genoma de desplazamiento (incluyendo los genes o segmento de genomas heterólogos) se añaden en una posición intergénica dentro de un genoma o antigenoma del RSV parcial o completo. Alternativamente, el gen o segmento de genoma pueden ser colocados en otras regiones no codificadoras del genoma, por ejemplo, dentro de las regiones codificadoras 5' o 3' o en otras posiciones en donde los nucleótidos no codificadores están presentes dentro del genoma o antigenoma parcial o completo. En un aspecto, las regiones reguladoras no codificadoras contienen señales de acción cis requeridas para la replicación, transcripción y traducción eficaces, y por tanto representan sitios diana para la modificación de estas funciones por introducción de un gen o segmento de genoma de desplazamiento u otra mutación como las descritas en la presente memoria. En más aspectos detallados de esta descripción, se introducen mutaciones atenuadoras en regiones reguladoras de acción cis para proporcionar, por ejemplo, (1) una atenuación específica de tejidos (Gromeier *et al.*, *J. Virol.*, 73:958-64, 1999; Zimmermann *et al.*, *J. Virol.*, 71:4145-9, 1997), (2) mayor sensibilidad al interferón (Zimmermann *et al.*, *J. Virol.*, 71:4145-9, 1997), (3) sensibilidad a la temperatura (Whitehead *et al.*, *Virology* 247:232-9, 1998), (4) una restricción general en el nivel de replicación (Men *et al.*, *J. Virol.*, 70:3930-7, 1996; Muster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5177-5181, 1991), y/o (5) restricción de la replicación específica del hospedante (Cahour *et al.*, *Virology* 207:68-76, 1995). Estas mutaciones atenuadoras pueden ser conseguidas de diversos modos para producir un RSV atenuado con posiciones de genes desplazadas de la invención, por ejemplo por mutaciones puntuales, intercambios de secuencias entre virus seleccionados o delecciones.

En otros aspectos alternativos de esta descripción, se proporcionan RSV con posiciones de genes desplazadas en donde los RSV recombinantes están modificados por delección, inserción, sustitución o transposición de una pluralidad de genes o segmento de genomas. En ciertos aspectos “conjuntos de genes” seleccionados son transferidos coordinadamente por uno de estos medios al, dentro, o desde, el genoma o antigenoma del RSV recombinante. Los genes del RSV recombinantes a partir de los cuales pueden ser seleccionados grupos de genes transferidos individual o coordi-

ES 2 317 914 T3

nadamente incluyen los genes N, P, NS1, NS2, M2-1 y M del RSV, que puede ser transferidos, solos o en cualquier combinación, a un genoma o antigenoma del RSV humano o bovino para producir un derivado con genes desplazados, y atenuado. En aspectos más detallados, ambos genes N y P de un RSV humano o bovino son delecionados, insertados, sustituidos o transpuestos coordinadamente (por ejemplo, por delección o sustitución coordinada en un genoma o

- 5 antigenoma de HRSV por los genes N y P equivalentes a partir de un RSV bovino). La transferencia coordinada de genes se facilita por cooperatividad funcional entre ciertos genes en el genoma del RSV, que frecuentemente surge en el caso de pares de genes vecinos en el genoma. Por tanto, en otros aspectos alternativos, ambos genes NS1 y NS2 son transferidos coordinadamente, por ejemplo, por sustitución en un RSV humano por los genes NS1 y NS2 equivalentes a partir de un RSV bovino. En otros aspectos adicionales, dos o más de los genes M2-1, M2-2 y L de un RSV son
10 transferidos coordinadamente. Para ciertos candidatos de vacunas para los cuales se desea un alto nivel de restricción de la gama de hospedantes, cada uno de los genes N, P, NS1, NS2, M2-1 y M de un RSV humano son reemplazados por los genes N, P, NS1, NS2, M2-1 y M equivalentes de un RSV bovino.

15 Las transferencias de genes coordinados dentro del RSV químérico humano-bovino también están dirigidas a la introducción de genes de antígenos humanos dentro de un genoma o antigenoma de fondo bovino. En ciertos aspectos, uno o más genes asociados a la envolvente del RSV humano seleccionados de F, G, SH, y M es/son añadidos o sustituidos dentro de un genoma o antigenoma de fondo del RSV bovino parcial o completo. Por ejemplo, uno o más genes asociados a la envolvente del RSV humano seleccionados de F, G, SH, y M pueden ser añadidos o sustituidos dentro de un genoma o antigenoma de fondo del RSV bovino parcial en el cual uno o más genes asociados a la
20 envolvente seleccionados de F, G, SH, y M es/están delecionado(s). En aspectos más detallados, uno o más genes de un conjunto de genes definidos como los genes F, G, y M asociados a la envolvente del RSV humano son añadidos dentro de un genoma o antigenoma de fondo del RSV bovino parcial en el cual están delecionados los genes F, G, SH, y M asociados a la envolvente. Uno de los RSV químéricos humano-bovino ilustrativos que lleva estas características descrito en los ejemplos más adelante es rBRSV/A2-MGF.

25 En otros aspectos de esta descripción, la inserción de secuencias de nucleótidos heterólogas en candidatos para vacuna del RSV se emplean separadamente para modular el nivel de atenuación de los recombinantes candidatos para vacunas, por ejemplo, para el tracto respiratorio superior. Por tanto, es posible insertar secuencias de nucleótidos en un rRSV que dirija tanto la expresión de una proteína extraña como que atenue el virus en un animal hospedante, o usar inserciones de nucleótidos separadamente para atenuar virus candidatos para vacunas. Se proporcionan herramientas y métodos para conseguir estos efectos, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/170.195, la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/458.813, y la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/459.062. En un ejemplo, la inserción del ORF de HA de sarampión entre una unión o empalme de genes del RSV seleccionados restringirá la replicación viral *in vivo*. En estos aspectos de esta descripción, la inserción del gen seleccionado puede ser relativamente grande (aproximadamente 1900 nts o mayor). En este contexto, el tamaño de las inserciones especifica un nivel seleccionable de atenuación del virus recombinante resultante. Las secuencias de desplazamiento de diversas longitudes derivadas de un virus heterólogo, por ejemplo, introducidas como unidades génicas (GU) sencillas y diseñadas específicamente para carecer de cualquier ORF significativo, revelan efectos de atenuación seleccionables debidos a la mayor longitud del genoma (es decir, frente a la expresión de un mRNA adicional). Otras construcciones en las cuales 30 se introducen inserciones de tamaño similar en una región no codificadora (NCR) situada aguas debajo de un gen del RSV también son útiles dentro de la presente descripción.
35

40 Para definir algunas de las reglas que gobiernan el efecto de la inserción de genes en la atenuación, pueden insertarse unidades génicas de longitudes variables en una cadena principal del RSV de tipo silvestre y ser examinados los efectos de la longitud de las unidades génicas sobre la atenuación. Las inserciones de unidades génicas manipuladas para no contener un ORF significativo permiten la evaluación del efecto de la unidad génica independientemente de un efecto de la proteína expresada de ese gen. Estas secuencias heterólogas fueron insertadas en una cadena de PIV como una unidad génica extra de tamaños entre 168 nts y 3918 nts entre los genes HN y L. Además se prepararon construcciones de cDNA de control y virus en los cuales fueron colocadas inserciones de tamaños similares en la región no codificadora 3' del gen HN de PIV y por tanto no implicó la adición de un gen extra. Estos virus se prepararon para determinar el efecto de un aumento de la longitud global del genoma y en el número de genes sobre la atenuación. La inserción de una unidad génica extra se espera que disminuya la transcripción de genes aguas abajo del sitio de la inserción lo cual afectará tanto a la abundancia global como a las relaciones de las proteínas expresadas. Como se demuestra en la presente memoria, las inserciones o extensiones de genes mayores que aproximadamente 3000 nts de longitud atenuaron el virus de tipo silvestre para los tractos respiratorios superior e inferior de hámsteres. Las inserciones de genes de aproximadamente 2000 nts de longitud atenuaron más el candidato para vacuna rHPIV3cp45L para el tracto respiratorio superior. Inserciones de genes comparables en RSV pueden por tanto tener un efecto dual atenuando tanto un virus candidato para vacuna como induciendo el efecto protector contra un segundo virus. Las extensiones de genes en la región no codificadora 3' de un gen, que no puede expresar proteínas adicionales, también pueden ser atenuadoras 45 en y por sí mismas. Dentro de estos métodos, la longitud de inserción de genes es un determinante de atenuación.
50

55 Un ejemplo separado de transposición del orden de genes de acuerdo con esta descripción implica cambiar la posición de uno o más genes que se presentan naturalmente con respecto a otros genes que también se presentan naturalmente, sin la introducción o delección de longitudes sustanciales de polinucleótidos (por ejemplo, mayores de 100 nucleótidos). Por ejemplo, los genes F y G de un RSV humano o químérico humano-bovino pueden ser desplazados desde sus posiciones naturales de orden de los genes hasta una posición más próxima al promotor por escisión y reinscripción de los genes en el genoma o antigenoma recombinante, sin alterar sustancialmente la longitud 60 del genoma o antigenoma del RSV recombinante.

Estas modificaciones en las posiciones y/o orden de los genes típicamente dan como resultado virus con propiedades biológicas alteradas. Por ejemplo, RSV recombinantes como los descritos en la presente memoria que carecen de uno o más genes seleccionados, por ejemplo NS1, NS2, SH, o G, NS1 y NS2 conjuntamente, y SH y G conjuntamente, pueden estar atenuados *in vitro*, *in vivo*, o en ambos. Aunque este fenotipo es probablemente atribuible principalmente a la pérdida de expresión de proteínas virales específicas, también es probable que el mapa de genes alterado contribuya al fenotipo. Esto está soportado por los resultados observados con el virus con delección de SH, que creció más eficazmente que el de tipo silvestre en algunos tipos de células debido probablemente a un aumento en la eficacia de la transcripción, la replicación o ambas resultante de la delección de genes y el cambio resultante en el orden de genes y posiblemente en el tamaño del genoma.

La capacidad para generar un RSV infeccioso a partir de cDNA proporciona un método para introducir cambios predeterminados en virus infecciosos vía el cDNA intermedio. Este método se ha usado para producir una serie de derivados infecciosos atenuados de la cepa A2 del RSV recombinante de tipo silvestre que contiene mutaciones atenuadoras que incluyen, por ejemplo, uno o más sustituciones de nucleótidos en señales de RNA de acción cis y/o uno o más sustituciones de aminoácidos en una o más proteínas virales y/o delección de uno o más genes o eliminación de su/sus expresión (Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 72:4467-4471, 1998; Whitehead *et al.*, *Virology* 247:232-239, 1998; Bermingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999; Juhasz *et al.*, *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 73:5176-5180, 1999; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:871-877, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; Collins *et al.*, *Adv. Virus Res.* 54:423-451, 1999; la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/143.097, presentada el 9 de julio de 1999, la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 09/611.829 y su correspondiente solicitud PCT publicada como WO 01/04321).

La cepa A2 representa el subgrupo antigenético A, y una vacuna del RSV eficaz también debe representar al otro subgrupo antigenético, el subgrupo B. Las glicoproteínas G y F son los principales determinantes antigenéticos y los principales antígenos protectores del RSV (Connors *et al.*, *J. Virol.*, 65:1634-1637, 1991; Murphy *et al.*, *Virus Research* 32:13-36, 1994; Collins *et al.*, *Fields Virology* 2: 1313-1352, 1996, y Crowe *et al.*, *New Generation Vaccines*, 711-725, 1997. Por lo tanto, los genes G y F de la cepa A2 recombinante fueron reemplazados por sus homólogos de la cepa B1 del subgrupo antigenético B (Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-9780, 1999). Esto se hizo usando cadenas principales de una cepa de tipo silvestre y atenuada A2. Se obtuvo el virus recombinante, y la "quimerización" no interfirió detectablemente con la replicación del virus. Esto demostró ser un método expeditivo para fabricar vacunas de virus: específicamente, usar cadenas principales de cepa A2 atenuada para expresar los determinantes antigenéticos del subgrupo B (solicitud de patente pendiente). Por tanto, una vez que se identifica, en pruebas clínicas, un virus para vacuna del RSV de subgrupo A apropiadamente atenuado con posiciones de genes desplazadas, su cadena principal puede ser modificada para producir una vacuna del subgrupo B comparable de un modo expeditivo, y los dos virus pueden ser combinados para preparar una vacuna bivalente.

También se ha demostrado en las referencias antes incorporadas que los RSV útiles dentro de esta descripción pueden expresar un gen extraño añadido como un gen extra, supernumerario colocado en cualquiera de una variedad de localizaciones genómicas, preferiblemente en una región intergénica. Este concepto se ha usado para preparar una virus recombinante de la cepa A2 que también expresaba la glicoproteína G del subgrupo B como un gen supernumerario. Por tanto, un solo virus expresó determinantes antigenéticos de los dos subgrupos. Otro ejemplo incorporado en la presente descripción implica la expresión de interferón gamma como un gen añadido, que dio como resultado atenuación sin una reducción de inmunogenicidad, y también proporcionó un método para reducir el nivel relativo de estimulación del subconjunto 2 de los linfocitos T coadyuvantes, que ha sido propuesto para mediar las respuestas inmunopatogénicas al RSV (véase, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/143.425, presentada el 13 de julio 13 de 1999, la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 09/614.285 y su solicitud PCT publicada correspondiente como WO 01/04271).

En aspectos alternativos de esta descripción, se proporciona una base diferente para la atenuación de una vacuna de virus vivo que incorpora un desplazamiento posicional de genes, la cual atenuación está basada en parte en efectos sobre la gama de hospedantes. A este respecto, se describen en la presente memoria RSV químéricos atenuados por la introducción de segmento de genomas, genes enteros o genes múltiples entre HRSV y BRSV. Las diferencias en la gama de hospedantes entre HRSV y BRSV se ilustran por el crecimiento altamente permisivo de HRSV en chimpancés comparado con el crecimiento escasamente detectable o no detectable de BRSV en el mismo animal. El chimpancé es un modelo de infección por RSV ampliamente aceptado y actividad inmunógena en seres humanos, presentando replicación del virus y enfermedad comparable a la de los humanos. Como se ilustra en la presente memoria más adelante, las diferencias en la gama de hospedantes del RSV químérico observadas en chimpancés están correlacionadas con diferencias en la gama de hospedantes observadas en cultivos de células, que proporcionan una valoración preliminar conveniente.

Los efectos en la gama de hospedantes observados en RSV químéricos humano-bovinos como los descritos en la presente memoria están generalmente relacionados con las diferencias en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos observadas entre HRSV y BRSV. Por ejemplo, la identidad de aminoácidos porcentual entre HRSV y BRSV para cada una de las siguientes proteínas es: NS1 (69%), NS2 (84%), N (93%), P (81%), M (89%), SH (38%), G (30%), F (81%), M2-1 (80%), L (77%). Debido a la extensiva divergencia genética entre HRSV y BRSV (el reemplazo del gen N de HRSV con el de BRSV, por ejemplo implica aproximadamente 26 diferencias de aminoácidos), los RSV químéricos bovino-humanos como los descritos en la presente memoria son candidatos para vacunas particularmente útiles. Como

se ilustra en la presente memoria más adelante, el reemplazo de las glicoproteínas G y F del BRSV con las del HRSV aumenta la permisividad del BRSV recombinante para la replicación en chimpancés. La implicación de múltiples genes y segmentos de genoma, cada uno confiriendo múltiples diferencias de aminoácidos o nucleótidos proporciona una amplia base para la atenuación que es altamente estable frente a la reversión. Este modelo de atenuación contrasta 5 netamente con los virus HRSV atenuados por una o varias mutaciones puntuales, en donde la reversión de un mutación individual proporcionará una re-adquisición significativa o completa de virulencia. Además las mutaciones puntuales atenuantes conocidas en HRSV típicamente proporcionan un fenotipo sensible a la temperatura. Esto se debe a que el fenotipo sensible a la temperatura se usó específicamente como primer tamiz para identificar la progenie alterada tras la exposición del HRSV a mutágenos. Un problema con la atenuación asociada a la sensibilidad a la temperatura 10 es que el virus puede estar excesivamente restringido para la replicación en el tracto respiratorio inferior mientras que está sub-atenuado en el tracto respiratorio superior. Esto es debido a que hay un gradiente de temperatura dentro de tracto respiratorio, siendo las temperaturas superiores (y más restrictivas) en los tractos respiratorios inferior y superior (menos restrictivas) en el tracto respiratorio superior. La capacidad de un virus atenuado de replicarse en el tracto respiratorio superior puede dar como resultado complicaciones que incluyen congestión, rinitis, fiebre y otitis media. 15 Por tanto, la atenuación conseguida solamente por las mutaciones sensibles a la temperatura puede no ser ideal. En contraste, las mutaciones que afectan a la gama de hospedante presentes en RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención no conferirán en la mayoría de los casos sensibilidad a la temperatura. Por lo tanto, este nuevo método de atenuación será: (i) más estable genéticamente y fenotípicamente, y (ii) será menos probable que esté asociado con 20 virulencia residual en el tracto respiratorio superior que otros casos de vacunas vivas.

La cantidad de divergencia de secuencias entre BRSV y HRSV es aproximadamente dos veces tanto como entre los subgrupos A y B de HRSV indicada anteriormente. Por tanto, las proteínas F tienen aproximadamente una divergencia de 20% de aminoácidos entre BRSV y HRSV, y las proteínas G aproximadamente 70% de divergencia (Lerch, *et al.*, *J. Virol.*, 64:5559-69, 1990; Lerch, *et al.*, *Virology* 181:118-31, 1991; Mallipeddi y Samal, *J. Gen. Virolog.*, 74:2001-4, 1993; Mallipeddi y Samal, *Vet. Microbiol.* 36:359-67, 1993; Samal *et al.*, *Virology* 180:453-456, 25 1991; Samal y Zamora, *J. Gen. Virol.*, 72:1717-1720, 1991; Zamora y Samal, *Virus Res.* 24:115-121, 1992; *ibid*, *J. Gen. Virol.*, 73:737-741, 1992; Mallipeddi y Samal, *J. Gen. Virol.*, 73:2441-2444, 1992, Pastey y Samal, *J. Gen. Virol.*, 76:193-197, 1995; Walravens *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 71: 3009-3014, 1990; Yunnus *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 79:2231-2238, 1998).

En las descripciones previas incorporadas en la presente memoria, el BRSV recombinante estaba modificado para 30 remplazar los genes G y F de BRSV con sus equivalentes de RSV humanos. El virus BRSV/HRSV químérico resultante, que lleva los determinantes antigenicos del RSV humano en la cadena principal del BRSV, se replicó más eficazmente en chimpancés que lo hizo su BRSV parental, pero permaneció altamente atenuado. Esto indicó que los genes G y F contribuían a la restricción de la gama de hospedantes del BRSV, pero mostró que uno o más de otros genes también especificaban la restricción de la gama de hospedantes. Esto representa un punto de partida para construir un virus BRSV/HRSV químérico óptimo que se caracteriza por un cambio posicional de genes como se ha descrito anteriormente y que contiene los determinantes antigenicos G y F del RSV humano, en donde el RSV recombinante resultante está atenuado por la presencia de uno o más genes de BRSV genes para conferirle una restricción de la gama 35 de hospedantes (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000; y la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/143.132, 40 presentada el 9 de julio de 1999).

Descripciones detalladas de los materiales y métodos para producir RSV recombinante a partir de cDNA, y para construir y analizar la gama completa de mutaciones y modificaciones de nucleótidos descritas en la presente memoria como aspectos complementarios de la presente descripción, se exponen, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/007,083, presentada el 27 de septiembre de 1995; la solicitud de patente de EE.UU. N° 08/720.132, presentada el 27 de septiembre de 1996; la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/021.773, 45 presentada el 15 de julio de 1996 y la solicitud de patente de EE.UU. N° 08/892.403, ahora expedida como Patente de EE.UU. N° 5.993.824; la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/046.141, presentada el 9 de mayo de 1997; la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/047.634, presentada el 23 de mayo de 1997; la Patente de 50 EE.UU. N° 5.993.824, expedida el 30 de noviembre de 1999 (correspondiente a la publicación de solicitud de patente internacional WO 98/02530); la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/291.894, presentada por Collins *et al.*, el 13 de abril de 1999 y correspondiente a la solicitud PCT publicada WO 00/61737; la solicitud de patente Provisional de EE.UU. N° 60/129.006, presentada por Murphy *et al.*, el 13 de abril de 1999; Crowe *et al.*, *Vaccine* 12: 691-699, 1994; 55 y Crowe *et al.*, *Vaccine* 12: 783-790, 1994; Collins, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 71(8):5814-5819, 1997; Durbin *et al.*, *Virology*, 235:323-332, 1997; Karron *et al.*, *J. Infect. Dis.* 176:1428-1436, 1997; He *et al.*, *Virology*, 237:249-260, 1997; Baron *et al.*, *J. Virol.*, 71:1265-1271, 1997; Whitehead *et al.*, *Virology*, 247(2):232-9, 1998a; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 72(5):4467-4471, 1998b; Jin *et al.*, *Virology* 251:206-214, 1998; Bukreyev, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2367-2372, 1999; 60 Bermingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999 Juhasz *et al.*, *Vaccine*, 17:1416-1424, 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 73:5176-5180, 1999; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-9780, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:871-877, 1999; y Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999.

Los métodos ilustrativos para producir RSV recombinante a partir de cDNA implican co-expresión intracelular, 65 típicamente a partir de plásmidos co-transfectados en células de cultivo de tejidos, de un RNA antigenómico del RSV y las proteínas N, P, M2-1 y L del RSV. Esto origina una infección productiva que da como resultado la producción de un virus infeccioso derivado de cDNA, que es denominado virus recombinante. Una vez generado el RSV recombinante se propaga fácilmente del mismo modo que el virus derivado biológicamente, y un virus recombinante y un virus

ES 2 317 914 T3

equivalente derivado biológicamente no pueden ser distinguidos a no ser que el primero haya sido modificado para contener uno o más cambios introducidos como marcadores.

En aspectos más detallados, los documentos de la técnica anterior citados anteriormente describen métodos y

5 procedimientos útiles dentro de la invención para mutagenizar, aislar y caracterizar RSV para obtener cepas mutantes
atenuadas (por ejemplo, cepas mutantes sensibles a la temperatura (*ts*), sometidas a pases en frío (*cp*), adaptadas al frío
(*ca*), de placas pequeñas (*sp*) y restringidas en la gama de hospedantes (*hr*)) y para identificar los cambios genéticos
que especifican el fenotipo atenuado. Junto con estos métodos, los documentos anteriores detallan procedimientos para
determinar la replicación, inmunogenicidad, estabilidad genética y eficacia protectora del RSV humano atenuado deri-
10 vado biológicamente y recombinantemente producido, incluyendo los subgrupos A y B del RSV humano, en sistemas
modelos aceptados, incluyendo sistemas modelos murino y primates no humanos. Además estos documentos descri-
ben métodos generales para desarrollar y analizar composiciones inmunógenas, incluyendo vacunas monovalentes y
bivalentes, para la profilaxis y tratamiento de la infección por RSV.

15 La capacidad para generar RSV infeccioso a partir de cDNA proporciona un método para introducir cambios pre-
determinados en virus infecciosos vía el cDNA intermedio. Se ha demostrado que este método produce una amplia
gama de derivados del RSV infecciosos y atenuados, por ejemplo candidatos para vacunas recombinantes que con-
tienen una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína viral, delección de uno o más genes o eliminación de
20 la expresión génica y/o uno o más sustituciones de nucleótidos en señales de RNA de acción cis que proporcionan
efectos deseados en el fenotipo viral (véase, por ejemplo, Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Whitehead *et*
al., *J. Virol.*, 72:4467-4471, 1998; Whitehead *et al.*, *Virology* 247:232-239, 1998; Birmingham y Collins, *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999; Juhasz *et al.*, *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 73:5176-
5180, 1999; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73: 871-877, 1999; Whitehead *et*
al., *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; y Collins *et al.*, *Adv. Virus Res.* 54:423-451, 1999).

25 Son ilustrativos de las enseñanzas anteriores métodos para construir y evaluar los RSV recombinantes infecciosos
modificados para incorporar mutaciones específicas del fenotipo identificadas en mutantes del RSV derivados bioló-
gicamente, por ejemplo, mutaciones *cp* y *ts* adoptadas en RSV recombinantes de los derivados biológicamente cpts
RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530
30 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5
(ATCC VR 2542), y RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579). Estos métodos se adaptan fácilmente para la construcción del
RSV recombinantes con posiciones de genes desplazadas de la invención. El RSV recombinante así obtenido puede
incorporar dos o más mutaciones *ts* del (de los) mismo(s) o diferente(s) mutante(s) del RSV, derivado(s) biológicamente
35 RSV, por ejemplo, uno o más de los mutantes biológicos 248/404, 248/955, 530/1009, o 530/1030. En el último
contexto, los recombinantes múltiplemente atenuados pueden tener una combinación de mutaciones atenuadoras de
dos, tres o más mutantes biológicos, por ejemplo, una combinación de mutaciones atenuadoras a partir de los mutantes
40 del RSV 530/1009/404, 248/404/1009, 248/404/1030, o 248/404/1009/1030. Por ejemplo, uno o más mutaciones
atenuadoras específicas una sustitución sensible a la temperatura en los aminoácidos Asn 43, Phe 521, Gln 831, Met
1169, o Tyr 1321 en el gen de la RSV polimerasa o una sustitución de nucleótidos sensible a la temperatura en la
45 secuencia de comienzo de gen del gen M2. Preferiblemente, estas mutaciones implican cambios idénticos o conserva-
dores con los siguientes cambios identificados en RSV mutantes derivados biológicamente, por ejemplo cambios
conservadores para las siguientes sustituciones identificadas en el gen de la L polimerasa: Ile por Asn 43, Leu por Phe
521, Leu por Gln 831, Val por Met 1169, y Asn por Tyr 1321.

50 Otras mutaciones adicionales que pueden ser incorporadas en los RSV con posiciones de genes desplazadas co-
mo los descritos en la presente memoria son mutaciones, por ejemplo, mutaciones atenuadoras, identificadas en RSV
heterólogos o virus de RNA de cadena negativa más distamente relacionados. En particular, las mutaciones ate-
nuantes y otras mutaciones deseadas identificadas en un virus de RNA de cadena negativa pueden ser “transferidas”,
55 por ejemplo, copiadas, en una posición correspondiente dentro de un genoma o antigenoma del RSV humano o bo-
vino, ya sea dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas o ya sea como un medio de construir el RSV
con posiciones de genes desplazadas. Brevemente, las mutaciones deseadas en un virus de RNA de cadena negativa
heterólogo son transferidas al RSV receptor (por ejemplo, RSV bovino o humano, respectivamente). Esto implica car-
50 tografiar la mutación en el virus heterólogo, identificando así por alineamiento de secuencias el sitio correspondiente
en RSV humano o bovino, y hacer mutar la secuencia natural en el RSV receptor para el genotipo mutante (bien sea
55 por una mutación idéntica o bien sea por una conservadora), como se describe en la solicitud de patente provisional
de EE.UU. Nº 60/129.006, presentada por Murphy *et al.*, el 13 de abril de 1999. Como enseña esta descripción es
preferible modificar el genoma o antigenoma químico para codificar una alteración en el sitio objeto de la mutación
que corresponda conservadoramente a la alteración identificada en el virus mutante meteorólogo. Por ejemplo, si una
60 sustitución de aminoácidos marca un sitio de mutación en el virus mutante comparado con la secuencia de tipo sil-
vestre correspondiente, entonces debe construirse una sustitución similar en el (los) residuo(s) correspondientes en el
virus recombinante. Preferiblemente la sustitución implicará un aminoácido idéntico o conservador al residuo susti-
tuto presente en la proteína viral mutante. Sin embargo, también es posible alterar en residuo de aminoácido natural
65 en el sitio de mutación no conservadora con respecto al residuo sustituto en la proteína mutante (por ejemplo, usando
cualquier otro aminoácido para interrumpir o perjudicar la función del residuo de tipo silvestre). Los virus de RNA de
cadena negativa a partir de los cuales se identifican mutaciones ilustrativas y se transfieren a un RSV con posiciones
70 de genes desplazadas de la invención incluyen otros RSV (por ejemplo, murino), PIV, virus Sendai (SeV), virus de la
enfermedad de Newcastle (NDV), virus 5 de los simios (SV5), virus de sarampión (MeV), virus de la peste *rinder*,
virus del moquillo canino (CDV), virus de la rabia (RaV) y virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se describe una

variedad de mutaciones ilustrativas, incluyendo, pero sin limitación, sustitución por un aminoácido de la fenilalanina de la posición 521 de la proteína L del RSV (correspondiente a una sustitución de la fenilalanina de la posición 456 de la proteína L de HPIV3). En el caso de mutaciones marcadas por delecciones o inserciones, estas pueden ser introducidas como delecciones o inserciones correspondientes en el virus recombinante, sin embargo puede variar el tamaño particular y la secuencia de aminoácidos del fragmento de la proteína delecionado o insertado.

También están descritos en la técnica anterior referenciada anteriormente una variedad de tipos adicionales de mutaciones y pueden ser fácilmente construidas en RSV con posiciones de genes desplazadas recombinante de la invención para calibrar la atenuación, la inmunogenicidad o proporcionar otras ventajas estructurales y/o efectos fenotípicos. Por ejemplo, se introducen rutinariamente marcadores de sitios de restricción dentro del genoma o antigenoma con posiciones de genes desplazadas para facilitar la construcción y manipulación de cDNA. También están descritas en la técnica anterior referencias a una amplia gama de modificaciones de nucleótidos distintas de mutaciones puntuales o específicas de sitio que son útiles dentro de la presente descripción. Por ejemplo, se describen métodos y composiciones para producir RSV recombinantes que expresan un gen extraño adicional, por ejemplo, un gen de cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) o de luciferasa. Dichos recombinantes exhiben generalmente un crecimiento reducido asociado con el gen insertado. Esta atenuación parece aumentar con el aumento de la longitud del gen insertado. El hallazgo de que la inserción de un gen extraño en RSV recombinante reduce el nivel de replicación y es estable durante el pase *in vitro* proporciona otro método eficaz para atenuar los RSV para uso en vacunas. Por tanto pueden conseguirse efectos similares o mejorados por inserción de otros genes deseados, por ejemplo citoquinas tales como interferón- γ , interleuquina-2, interleuquina-4 y GM-CSF, entre otros.

Dentro de los métodos descritos en la presente memoria, pueden insertarse genes o segmentos de genoma adicionales en o próximo al genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas. Estos genes pueden estar bajo el control común con genes receptores o pueden estar bajo el control de conjunto independiente de señales de transcripción. Los genes de interés incluyen los genes de RSV identificados anteriormente, así como genes que no son del RSV. Los genes de interés que no son del RSV incluyen los que codifican citoquinas (por ejemplo, IL-2 hasta IL-18, especialmente IL-2, IL-6 y IL-12, IL-18, etc.), gamma-interferón, y epítopos de células coadyuvantes T ricos en proteínas. Estas proteínas adicionales pueden ser expresadas bien sea como una proteína separada o bien sea como una químera manipulada a partir de una segunda copia de una de las proteínas del RSV, tales como SH. Esto proporciona la capacidad de modificar y mejorar las respuestas inmunes contra RSV tanto cuantitativamente como cualitativamente.

La longitudes de genoma aumentadas dan como resultado atenuación del RSV resultante, dependiente en parte de la longitud de la inserción. Además la expresión de ciertas proteínas, por ejemplo, una citoquina, a partir de un gen que no es del RSV insertado en el RSV con posiciones de genes desplazadas dará como resultado la atenuación del virus debido a la acción de la proteína. Citoquinas ilustrativas que proporcionan un fenotipo viral infeccioso y atenuado y elevado nivel de expresión de citoquina a partir de células del RSV transfectadas incluyen interleuquina-2 (IL-2), IL-4, GM-CSF, y γ -interferón. Los efectos adicionales incluyendo el aumento de respuestas inmunes celulares y/o humorales también implicarán la introducción de citoquinas en RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención.

Las delecciones, inserciones, sustituciones y otras mutaciones que implican cambios de genes virales completos o segmentos de genoma dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria proporcionan candidatos para vacunas altamente estables, que son particularmente importantes en el caso de individuos inmunosuprimidos. Muchos de estos cambios darán como resultado la atenuación de las cepas vacunales resultantes, mientras que otros especificarán diferentes tipos de cambios fenotípicos deseados. Por ejemplo, los genes accesorios (es decir, no esenciales para el crecimiento *in vitro*) son excelentes candidatos para codificar proteínas que específicamente interfieren con la inmunidad del hospedante (véase, por ejemplo, Kato *et al.*, *EMBO J.* 16:578-87, 1997). La eliminación de dichos genes en virus químicos para vacunas se espera que reduzca la virulencia y la patogénesis y/o mejore la inmunogenicidad.

Las modificaciones de nucleótidos independientes adicionales descritas en las referencias anteriores para incorporación en RSV recombinante con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria incluyen delección o eliminación parcial o completa de un gen del RSV seleccionado. Por tanto, pueden ser delecionados genes o segmentos de genoma del RSV, incluyendo delecciones parciales o completas de marcos de lecturas abiertos y/o secuencias reguladoras de acción cis de los genes NS1, NS2, N, P, M, G, F, SH, M2(ORF1), M2(ORF2) y/o L del RSV. En un ejemplo, se generó un RSV recombinante en el cual se había eliminado la expresión del gen SH por eliminación de una secuencia de polinucleótido que codificaba el mRNA del gen SH y la proteína. La delección del gen SH proporcionó no sólo RSV infecciosos y recuperables, sino uno que exhibió un crecimiento sustancialmente mejorado en cultivo de tejidos basado tanto en el rendimiento de virus infecciosos como en el tamaño de placas. Este crecimiento mejorado en cultivo de tejidos especificado por la delección de SH proporciona herramientas útiles para desarrollar vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas, por ejemplo, superando los problemas de pobres rendimientos del RSV en cultivo. Además, estas delecciones son altamente estables contra la reversión genética, haciendo que los clones del RSV derivados por dicha técnica particularmente útiles como agentes vacunales.

Los RSV recombinantes carentes del gen SH (SH-minus) también exhiben atenuación específica de sitio en el tracto respiratorio superior de ratones, lo cual presenta nuevas ventajas para el desarrollo de vacunas. Las cepas del RSV usuales en evaluación como vacunas de virus vivos, por ejemplo, mutantes *cp*, no exhiben un crecimiento significativamente alterado en cultivos de tejidos. Estas son mutaciones que afectan a la gama de hospedantes y restringen la

replicación en el tracto respiratorio de chimpancés y seres humanos aproximadamente 100 veces en el tracto respiratorio inferior. Otro tipo ilustrativo de mutación, las mutaciones *ts*, tiende a restringir preferiblemente la replicación del virus en el tracto respiratorio inferior debido al gradiente de temperatura corporal creciente desde el tracto respiratorio superior al inferior. En contraste a estos mutantes *cp* y *ts*, los RSV mutantes SH-minus tienen distintos fenotipos de mayor restricción en el tracto respiratorio superior. Esto es particularmente deseable para virus de vacunas para uso en bebés muy jóvenes, porque se requiere la restricción de la replicación en el tracto respiratorio superior para asegurar la administración segura de la vacuna en este grupo de edad vulnerable, cuyos miembros respiran predominantemente por la nariz. Además en cualquier grupo de edad, la replicación reducida en el tracto respiratorio superior reducirá la morbilidad por otitis media. Además de estas ventajas, la naturaleza de las mutaciones por delección de SH, que implican, por ejemplo, casi 400 nucleótidos y la eliminación de un mRNA completo, representa un tipo de mutación que será altamente refractaria a la reversión. La utilidad de la delección SH-minus como un “polinucleótido de desplazamiento” para dirigir simultáneamente un desplazamiento de la posición de genes, por ejemplo, para sobre-regular la expresión de los genes de las glicoproteínas F y G, es puesta ampliamente de manifiesto en los ejemplos que siguen.

También se analiza en el contexto de las modificaciones de los genes SH una comparación de los genes SH entre diferentes RSV, incluyendo RSV humano y bovino, y otros neumovirus para proporcionar herramientas y métodos adicionales para generar vacunas del RSV recombinante útiles. Por ejemplo, los dos subgrupos, A y B, antigenéticos del RSV exhiben un grado relativamente alto de conservación en ciertos dominios de SH. En dos de tales dominios, la región N-terminal y los supuestos dominios de que se extiende por la membrana del RSV A y B presentan 84% de identidad en el nivel de aminoácidos, mientras que los supuestos ectodominios C-terminal son más divergentes (aproximadamente 50% de identidad). La comparación de los genes SH de dos cepas del RSV humano del subgrupo B, 8/60 y 18537, identificó solamente una diferencia de aminoácidos (Anderson *et al.*, *supra*). Las proteínas SH del RSV humano frente a bovino son aproximadamente 40% idénticas, y comparten las principales características estructurales incluyendo: (i) una distribución asimétrica de residuos conservados; (ii) perfiles de hidrofobicidad muy similares; (iii) la presencia de dos sitios de glicosilación N-enlazados con un sitio que está en cada lado de la región hidrófoba; y (iv) un solo residuo de cisteína en el lado del carboxi terminal de la región central hidrófoba de cada proteína SH. (Anderson *et al.*, *supra*). Evaluando estas y otras similitudes y diferencias de secuencias, se pueden hacer selecciones de secuencia(s) heteróloga(s) que pueden ser sustituidas o insertadas dentro de clones del RSV con posiciones de genes desplazadas e infecciosos, por ejemplo para producir vacunas que tienen efectos inmunógenos multi-específicos o, alternativamente o además, efectos deseables, tales como atenuación.

En aspectos alternativos de esta descripción, las delecciones de genes parciales de genes u otras delecciones de nucleótidos limitadas se realizan en RSV recombinante para producir cambios fenotípicos deseados. En un ejemplo, la longitud del genoma del RSV se reduce delecionando secuencia de la región no codificadora situada aguas abajo del gen SH. Esta delección de genes parcial ilustrativa se construyó usando un versión del cDNA antigenómico que contiene un sitio *Xma*I en la región intergénica G-F, un cambio del que por sí mismo no se podía esperar que afectara al virus codificado. El virus codificado, denominado RSV/6120, tiene sustituciones de nucleótidos silenciosas en los tres últimos codones y el codón de terminación del ORF de SH y tiene una delección de 112 nucleótidos desde la región no traducida aguas abajo del SH (posiciones 4499-4610 en el antigenoma recombinante). Esta delección deja intacta la señal de fin de gen (Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996). Estas mutaciones puntuales y la delección de 112 nts no alteran los aminoácidos codificados de cualquiera de las proteínas virales, ni interrumpen cualquiera de las señales de RNA viral ni cambian el número de mRNA codificados.

El virus 6120 se analizó en cuanto su eficacia de crecimiento en múltiples etapas en paralelo con su equivalente de longitud completa, D53, y mostró un título máximo que fue reproduciblemente superior al del virus D53 en un factor de 1,5 a 2 veces. Por tanto, la pequeña delección parcial en el gen SH de una secuencia no codificadora de 112 nts dio como resultado un aumento sustancial en eficacia de crecimiento *in vitro*.

Otras delecciones de genes parciales y pequeñas delecciones de nucleótidos pueden realizarse fácilmente en RSV recombinante como las descritas en la presente memoria para alterar el fenotipo viral, incluyendo delecciones de nucleótidos en: (1) secuencia traducida al comienzo y/o al final de los diversos ORF aparte de la señal de RNA de acción *cis*, (2) regiones intergénicas, y (3) las regiones de las secuencias delantera 3' y trasera 5' que no son esenciales para la actividad del promotor. Ejemplos de secuencias de genes no traducidas para delección o inserción incluyen las siguientes regiones de la región no traducida situada aguas debajo de los genes NS1, NS2, P, M, F, y M2: es decir, las posiciones en la secuencia 519-563, 1003-1086, 3073-3230, 4033-4197, 7387-7539 y 8433-8490, respectivamente, numeradas de acuerdo con el antigenoma recombinante. También, como ejemplos adicionales, los nts 55-96, nts 606-624, nts 4231-4300 pueden ser delecionados de la región no traducida situada aguas arriba de los genes NS1, NS2 y SH respectivamente. Cualquier delección parcial o completa en una o más de estas secuencias pueden ser conseguidas de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria para proporcionar candidatos que se escrutan fácilmente para cambios fenotípicos especificados por delecciones seleccionadas. Otras regiones no traducidas adicionales dentro del genoma del RSV también son útiles a este respecto. Puesto que las señales de comienzo de gen y de fin de gen han sido cartografiadas o caracterizadas con respecto a importantes posiciones (Kuo, *et al.*, *J. Virol.*, 71:4944-4953; 1997; Harmon, *et al.*, *J. Virol.*, 75:36-44, 2001) pueden ser consideradas delecciones o modificaciones que implican uno o unos cuantos nts (por ejemplo, 3-10, 10-20, 20-45). En algunos casos pueden obtenerse ventajas específicas adicionales. Por ejemplo, en el gen G, la delección de los nts 4683 a 4685, que incluye un nt de la señal de comienzo de gen y dos nts de secuencia no traducida, elimina el primer codón AUG en el mRNA, que no inicia un ORF significativo, pero se cree que aparta a los ribosomas del siguiente codón AUG que inicia el ORF de G. Además esta delección restablece la señal GS y retiene el sitio de inicio de la traducción del ORF de G. Por tanto, pueden seleccionarse sitios no traducidos para

ES 2 317 914 T3

modificación basándose en el conocimiento del genoma, o pueden seleccionarse al azar y analizarse expeditivamente por los métodos descritos en la presente memoria.

Con relación a las secuencias intergénicas los estudios con minigenomas muestran que una región intergénica 5 puede ser reducida a un solo nt o delecionada conjuntamente sin afectar a la transcripción y replicación del RNA. Las regiones intergénicas de la cepa A2 representan otro agregado de 207 nts (advirtiendo que la región intergénica NS2-N del antigenoma recombinante se manipuló para ser 1 nt más grande que su equivalente biológico; véase por ejemplo, Collins, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 11563-11567, 1995).

10 La región trasera 5' del RSV tiene una longitud de 155 nts y por tanto es aproximadamente 100 nts más grande que la región correspondiente de la mayoría de los mononegavirus y es 111 nts más grande que la región delantera del RSV. Estudios con minigenomas sugieren que la mayor parte de esta secuencia no es esencial y es un candidato para la modificación (Kuo, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6892-901, 1996). Por ejemplo, la región trasera que inmediatamente sigue al gen L puede ser reducida en su tamaño en 75 nts, 100 nts, 125 nts o más, dejando intacto el extremo (extremo) 15 genómico 5' (que codifica el extremo 3' del antigenoma, incluyendo el promotor del antigenoma). Similarmente, debería ser modificada, la región delantera de 44 nts. Por ejemplo, los primeros 11 nts del extremo 3' forman el núcleo del promotor viral, y por tanto la secuencia del resto de la región delantera debería ser delecionada o modificada de otro modo.

20 En ciertos aspectos de esta descripción, delecionar una o más de las secuencias no traducidas (parcialmente o completamente) anteriormente descritas para los genes NS1, NS2, SH, F y M2 dará como resultado un reducción ajustable en la longitud del genoma de hasta 806 nts más de 7 veces mayor la delección de 112 nts descrita en el presente ejemplo. Delecionando parcialmente o completamente una o más de las regiones intergénicas entre los nueve primeros genes (por ejemplo, hasta una longitud mínima de un nt cada uno) se obtendrían 198 nts adicionales de 25 delección ajustable. Las delecciones parciales o completas de la parte trasera y/o delantera pueden proporcionar hasta 50, 75, 100, o más nts de delección adicional. Así, por ejemplo, combinando 806 nts de la secuencia génica no traducida con 198 nts de las regiones intergénicas y 100 nts de la parte trasera proporciona 1104 nts en total, lo que representa casi 10 veces más delección que la delección de 112 nts descrita aquí (y que representa más del 7% del genoma del RSV).

30 En otro ejemplo descrito en las referencias de la técnica anterior citadas anteriormente, la expresión del gen NS2 es eliminada por la introducción de codones de parada en el marco de lectura abierto (ORF) traduccional. La velocidad de liberación de virus infecciosos se redujo para este virus con el gen NS2 desactivado (*knock-out*) comparada con la del tipo silvestre. Además la comparación de las placas del virus mutante y el de tipo silvestre mostró que las del virus con el gen NS2 desactivado tenían un tamaño grandemente reducido. Este tipo de mutación puede por tanto ser incorporado dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas recombinante y viable para producir fenotipos alterados, en este caso una velocidad reducida de crecimiento del virus y tamaño de placa reducido *in vitro*. Estos y otros métodos y mutantes por desactivación proporcionaron por tanto todavía agentes para vacunas del RSV recombinante, basados en la correlación conocida entre tamaño de placa reducido *in vitro* y atenuación *in vivo*. La expresión del gen NS2 40 también fue suprimida por eliminación completa del gen NS2, proporcionando un virus con un fenotipo similar.

Otros genes del RSV que han sido satisfactoriamente delecionados incluyen los genes NS1 y M2-2. El primero fue delecionado por eliminación de la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína respectiva, y el segundo 45 introduciendo un desplazamiento de marco o alterando los sitios de comienzo de la traducción e introduciendo codones de parada. Interesantemente el virus NS1-minus recuperado produjo pequeñas placas en cultivo de tejidos, a pesar de no ser tan pequeño como el virus con delección del gen NS2. El hecho de que el virus NS1-minus pueda crecer, aunque sea con eficacia reducida, identifica la proteína NS1 como una proteína accesoria, una que es prescindible para el crecimiento del virus. El tamaño de placa del virus NS1-minus fue similar al del virus con el gen NS2 desactivado 50 en el cual la expresión de la proteína NS2 estaba eliminada por introducción de codones de parada de la traducción en su secuencia codificadora. El fenotipo de pequeñas placas está comúnmente asociado con mutaciones atenuadoras. Este tipo de mutación puede por tanto ser independientemente incorporado dentro del RSV recombinante viable para producir fenotipos alterados. Estos y otros métodos y mutantes por desactivación proporcionarán por tanto agentes 55 para vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas recombinante adicional, basados en la conocida correlación entre tamaño de placas *in vitro* y atenuación *in vivo*. El mutante con el gen NS2 desactivado exhibió un fenotipo moderadamente atenuado en el tracto respiratorio superior y un fenotipo altamente atenuado en el tracto respiratorio inferior en chimpancés no infectados. Este mutante también desencadenó síntomas de enfermedad grandemente reducidos en chimpancés, mientras que estimuló una resistencia significativa a la infección por el virus de tipo silvestre (Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999).

60 Otros métodos y composiciones adicionales proporcionados dentro de las referencias de la técnica anterior citada que pueden ser útiles dentro de la invención implican modificaciones de nucleótidos diferentes dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas que alteran las secuencias de acción reguladora cis dentro del genoma o antigenoma químérico. Por ejemplo, puede ser delecionado un sitio de comienzo de la traducción para una forma secretada de la glicoproteína G del RSV para interrumpir la expresión de esa forma de la glicoproteína G. La proteína G del RSV es sintetizada en dos formas: como una proteína de membrana integral de tipo II anclada y como una forma N-65 terminalmente separada que carece esencialmente de la totalidad del anclaje a la membrana y es secretada (Hendricks *et al.*, *J. Virol.*, 62:2228-2233, 1988). Las dos formas han demostrado ser derivadas por comienzo de la traducción en dos sitios de iniciación diferentes: la forma más grande se inicia en el primer codón AUG del ORF de G, y la segunda

se inicia en el segundo codón AUG del ORF en el codón 48 y es procesada posteriormente por proteólisis (Roberts *et al.*, *J. Virol.*, 68: 4538-4546, 1994). La presencia de este segundo sitio de iniciación está altamente conservada, estando presente en todas las cepas del RSV humano, bovino y ovino secuenciadas hasta la fecha. Se ha sugerido que la forma soluble de la proteína G podría mitigar la inmunidad del hospedante actuando como un señuelo para atrapar anticuerpos neutralizantes. También, la G soluble ha estado implicada en la estimulación preferencial de la respuesta desviada por Th2, que a su vez parece estar asociada con inmunopatología aumentada por subsiguiente exposición a RSV. Con respecto a un virus para vacuna del RSV, es altamente deseable minimizar el atrapamiento de anticuerpos o la estimulación desequilibrada del sistema inmune, y por tanto sería deseable eliminar la expresión de la forma secretada de la proteína G. Esto se ha conseguido en virus recombinantes. Por tanto, esta mutación es particularmente útil para alterar cualitativamente y/o cuantitativamente la respuesta inmune del hospedante desencadenada por el virus recombinante, en lugar de atenuar directamente el virus.

Las referencias de la técnica anterior citadas describen también la modulación del fenotipo del RSV recombinante alterando las señales de transcripción de acción cis de genes ilustrativos, por ejemplo, NS1 y NS2. Los resultados de estas modificaciones de nucleótidos son consistentes con la modificación de la expresión de genes alterando los elementos reguladores cis, por ejemplo para disminuir los niveles de mRNA de lectura completa del mRNA y aumentar la expresión de las proteínas de los genes situados aguas abajo. Los virus recombinantes resultantes exhibirán preferiblemente mayor cinética de crecimiento y mayor tamaño de placas. Las modificaciones ilustrativas en las secuencias reguladoras de acción cis incluyen modificaciones en las señales de fin de gen (GE) y comienzo de gen (GS) asociadas con genes del RSV. En este contexto, los cambios ilustrativos incluyen alteraciones de las señales GE de los genes NS1 y NS2 haciendo a estas señales idénticas a las señales GE que existen naturalmente del gen N del RSV. El virus recombinante resultante exhibe mayor cinética de crecimiento y tamaño de placas y por tanto proporciona otros medios adicionales para modificar beneficiosamente fenotipos de candidatos para vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas.

Los métodos y composiciones proporcionados en las referencias de la técnica anterior citadas también permiten la producción de virus para vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas y atenuados que comprenden secuencias de ambos subgrupos A y B del RSV, por ejemplo, para proporcionar una vacuna A o B del RSV o una vacuna bivalente A/B del RSV (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. Nº 09/291.894, presentada por Collins *et al.*, el 13 de abril de 1999). En este contexto, pueden incorporarse mutaciones atenuadoras específicas en virus A/B del RSV químéricos que incluyen: (i) tres de las cinco mutaciones *cp*, a saber: la mutación en N (V2671) y las dos en L (C319Y y H1690Y), pero no las dos en F puesto que estas están eliminadas por sustitución con los genes G y F; (ii) las mutaciones 248(Q831L), 1030(Y1321 N) y, opcionalmente, 404-L (D1183E) que han sido identificadas en virus de la cepa A2 atenuados; (iii) la sustitución de uno solo nucleótido en la posición 9 en la señal de comienzo de gen del gen M2, y (iv) la delección del gen SH. Otras mutaciones inmediatamente disponibles en los RSV con posiciones de genes desplazadas que llevan los genes o segmentos de genoma A del RSV y/o B del RSV incluyen, pero sin limitación: delecciones de los genes NS1, NS2, G, o M2-2, y las mutaciones 530 y 1009, solas o en combinación.

En otros aspectos detallados de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas se emplean como "vectores" para antígenos protectores de patógenos heterólogos, incluyendo otros RSV y virus que no son RS y patógenos no virales. Dentro de estos aspectos, el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas comprende un "genoma o antigenoma vector" del RSV parcial o completo combinado con uno o más genes o segmentos de genoma heterólogos que codifican uno o más determinantes antigenicos de uno o más patógenos heterólogos (véase, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/170.195; la solicitud de patente de EE.UU. Nº 09/458.813; y la solicitud de patente de EE.UU. Nº 09/459.062). El patógeno heterólogo en este contexto puede ser un RSV heterólogo (por ejemplo, una cepa o subgrupo del RSV diferente) y el (los) gene(es) o segmento(s) de genoma heterólogo pueden ser seleccionados para codificar una o más de las proteínas del RSV anteriormente identificadas, así como dominios de proteínas, sus fragmentos y regiones o epítopos inmunógenos. Las vacunas vectores del RSV así construidas pueden desencadenar una respuesta inmune poli-específica y puede ser administradas simultáneamente o en un protocolo de administración coordinado con otros agentes vacunales.

Los RSV con posiciones de genes desplazadas manipulados como vectores para otros patógenos pueden comprender un genoma o antigenoma vector que es un genoma o antigenoma de HRSV parcial o completo, que está combinado con, o está modificado para incorporar, uno o más genes o segmentos de genoma heterólogos que codifican determinante(s) antigenico(s) de uno o más RSV heterólogos, incluyendo HRSV heterólogos seleccionados de HRSV A o HRSV B. En aspectos alternativos, el genoma o antigenoma vector es un genoma o antigenoma de HRSV parcial o completo y el (los) gen(es) o segmento(s) de genoma(s) heterólogo(s) que codifican los determinante(s) antigenico(s) es/son de uno o más patógenos que no son RSV. El genoma o antigenoma vector puede incorporar además uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma de un BRSV que especifica atenuación. Alternativamente, el virus vector puede estar comprendido en un genoma o antigenoma de fondo de BRSV parcial o completo que incorpora uno o más genes o segmentos de genoma de HRSV, en donde el virus vector RSV con posiciones de genes desplazadas está modificado para incluir uno o más gen(es) o segmento(s) de genoma donador(es) que codifican un determinante antigenico de un patógeno que no es RSV.

Por tanto, en ciertos aspectos detallados de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas se proporcionan como vectores para una gama de patógenos que no son RSV (véase, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/170.195; la solicitud de patente de EE.UU. Nº 09/458.813; y la solicitud de patente

de EE.UU. N° 09/459.062). El genoma o antigenoma vector para uso dentro de estos aspectos puede comprender un genoma o antigenoma de BRSV o HRSV parcial o completo que incorpora, respectivamente, un gen o segmento de genoma de HRSV o BRSV heterólogos, y el patógeno heterólogo puede ser seleccionado de virus de sarampión, virus sincitial respiratorio subgrupo A y subgrupo B, BPIV1, HPIV2, HPIV3, virus de paperas, virus de papilomas humanos, 5 virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2, virus herpes simplex, citomegalovirus, virus de la rabia, virus de Epstein-Barr, filovirus, bunyavirus, flavivirus, alfavirus y virus de la gripe.

Por ejemplo, un genoma o antigenoma vector de HRSV o BRSV para construir RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria puede incorporar determinante(s) antigénico(s) heterólogo(s) 10 seleccionados de las proteínas HA y F del virus del sarampión o sus dominios, fragmentos y epítopos antigenicos. Por ejemplo, una unidad de transcripción que comprende un marco de lectura abierto (ORF) de un gen HA del virus del sarampión es añadido a, o incorporado dentro de, un genoma o antigenoma vector de BRSV o HRSV3. Alternativamente los RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención pueden usarse como vectores para incorporar determinante(s) antigénico(s) heterólogo(s) de un virus de parainfluenza (PIV), por ejemplo incorporando uno o más genes 15 o segmentos de genoma que codifica(n) una glicoproteína de HPIV1, HPIV2, o HPIV3 HN o F o su(s) dominio(s) o epítopo(s) inmunógeno(s).

La introducción de proteínas inmunógenas heterólogas, sus dominios y epítopos dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas es particularmente útil para generar nuevas respuestas inmunes en un hospedante inmunizado. 20 Por ejemplo, la adición o sustitución de un gen o segmento de genoma inmunógeno de un subgrupo o cepa del RSV donador dentro de un genoma o antigenoma receptor de un subgrupo o cepa del RSV diferente puede generar una respuesta inmune dirigida contra el subgrupo o cepa donador, el subgrupo o cepa receptor, o contra ambos el subgrupo o cepa donador y receptor. Para conseguir este fin, también pueden ser construidos RSV con posiciones de genes desplazadas que expresan una proteína químérica, por ejemplo, una glicoproteína inmunógena que tiene 25 una cola citoplásica y/o un dominio transmembranal específico para un RSV fusionado a un ectodominio de un RSV diferente para proporcionar, por ejemplo, una proteína de fusión humano-bovino, o una proteína de fusión que incorpora dominios de dos subgrupos o cepas del RSV humanos diferentes. En un aspecto preferido, un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas codifica una glicoproteína químérica en el virus o partícula subviral recombinante que tiene ambos dominios o epítopos inmunógenos de glicoproteínas humanas y bovinas. Por 30 ejemplo, un segmento de genoma heterólogo que codifica un ectodominio de glicoproteína de una glicoproteína F, SH o G del RSV humano puede ser unido con una secuencia de polinucleótido (es decir, un segmento de genoma) que codifica los dominios citoplásicos y endodominio de las glicoproteínas F, SH o G bovinas correspondientes para formar el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas.

35 En otros aspectos de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas útiles en una formulación de vacuna pueden ser modificados convenientemente para acomodar la deriva antigénica en virus circulantes. Típicamente la modificación será en las proteínas G y/o F. Un gen G o F completo o un segmento de genoma que codifica una de sus regiones inmunógenas particulares, a partir de una cepa del RSV es incorporado en un cDNA de un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas por reemplazo de una región correspondiente en un clon 40 receptor de una cepa o subgrupo del RSV diferente, o añadiendo una o más copias del gen, tal que estén representadas varias formas antigénicas. Los virus de la progenie producidos a partir de los clones modificados del RSV pueden ser usados luego en protocolos de vacunación contra cepas RSV emergentes.

Una variedad de aspectos adicionales de esta descripción implican la adición o sustitución de solamente una porción 45 de un gen donador de interés para el genoma o antigenoma del RSV receptor con posiciones de genes desplazadas. Comúnmente, nucleótidos no codificadores, tales como elementos reguladores de acción cis y las secuencias intergénicas no necesitan ser transferidos con la región codificadora del gen donador. Por tanto, una secuencia codificadora (por ejemplo, marco de lectura abierto (ORF) parcial o completo) de un gen particular puede ser añadida o sustituida en el genoma o antigenoma de fondo parcial o completo bajo el control de un promotor heterólogo (por ejemplo, un 50 promotor que existe en el genoma o antigenoma de fondo) de un gen equivalente o un gen diferente comparado con la secuencia donadora. Una variedad de segmentos de genoma adicionales proporcionan polinucleótidos donadores útiles para la inclusión dentro de un genoma o antigenoma químérico para expresar RSV con posiciones de genes desplazadas que tiene propiedades nuevas y útiles. Por ejemplo, segmentos de genoma heterólogos pueden codificar parte o la totalidad de la región trasera de una glicoproteína citoplásica, el dominio o ectodominio transmembranal, 55 un sitio o región epítópica, un sitio de unión o región que contiene un sitio de unión, un sitio activo o una región que contiene un sitio activo, etc., de una proteína seleccionada de un RSV humano o bovino. Estos y otros segmentos de genoma puede ser añadidos a un genoma o antigenoma de fondo completo o sustituidos en él por segmento de genoma equivalente para proporcionar nuevos RSV recombinantes químéricos. Ciertos recombinantes expresarán una proteína químérica, por ejemplo, una proteína que tiene una cola citoplásica y/o dominio transmembranal de un RSV 60 fusionado a un ectodominio de otro RSV.

Los genes y segmentos de genoma para uso dentro de los RSV con posiciones de genes desplazadas descritos en la 65 presente memoria abarcan un ensamblaje de polinucleótidos alternados que tienen una gama de tamaños y variación de secuencia. Los segmentos de genoma útiles en este contexto varían desde aproximadamente 15 a 35 nucleótidos en el caso de segmentos de genoma que codifican pequeños dominios funcionales de proteínas, por ejemplo, sitios epítópicos, hasta aproximadamente 50, 75, 100, 200-500, y 500-1,500 o más nucleótidos para segmentos de genoma que codifican dominios o regiones de proteínas más grandes. La selección de genes y segmentos de genoma equivalentes se basa en la identidad de secuencias o la correspondencia lineal en el genoma entre los equivalentes considerados.

ES 2 317 914 T3

En este contexto una “secuencia de referencia” de polinucleótido seleccionada humana o bovina se define como una secuencia o su porción presente en el genoma o antigenoma del donador o receptor. Esta secuencia de referencia se usa como una secuencia definida para proporcionar una base racional para la comparación de secuencias con la secuencia heteróloga equivalente. Por ejemplo, la secuencia puede ser un segmento definido de un cDNA o gen, o un cDNA

5 completo o secuencia de genes. Generalmente, una secuencia de referencia para uso en definir genes y segmentos de genoma equivalentes tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos, frecuentemente al menos una longitud de 25 nucleótidos, y frecuentemente al menos una longitud de 50 nucleótidos. Puesto que dos polinucleótidos pueden cada uno: (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos en una “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguas en donde una secuencia de polinucleótido puede ser comparada con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y en donde la porción

10 de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de 20% o menos comparada con la secuencia de referencia (que no contiene adiciones o delecciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, por el algoritmo de alineamiento de homologías de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, por la búsqueda

15 por el método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444, 1988, por implementaciones en ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en The Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que da como resultado el más alto porcentaje de similitud de secuencia en la ventana de comparación) generado por los diversos métodos. La expresión “identidad de secuencia” significa que dos secuencias

20 de polinucleótido son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido-por-nucleótido) en la ventana de comparación. La expresión “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las estás presentes bases de ácidos nucleicos idénticas (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones igualadas, dividir el número de posiciones igualadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicar el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencias.

Las posiciones de residuos correspondientes, por ejemplo, entre dos RSV humanos diferentes o entre un RSV bovino y un RSV humano, pueden ser divergentes, idénticas o pueden diferir en sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo conservador de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxílicas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, y histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, tales como los aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales

35 también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosforserina, N-acetilserina, N-formilmctionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). Además, los aminoácidos pueden ser modificados por glicosilación, fosforilación y similares.

50 La presente descripción se basa en métodos basados en cDNA para construir una variedad de virus y partículas subvirales del RSV con posiciones de genes desplazadas y recombinantes. Estos RSV recombinantes ofrecen características mejoradas de atenuación e inmunogenicidad para uso como agentes vacunales. Los cambios fenotípicos deseados que se realizan en RSV con posiciones de genes desplazadas incluyen, pero sin limitación: atenuación en cultivo o en un medio hospedante seleccionado, resistencia a la reversión desde el fenotipo atenuado, características inmunógenas mejoradas (por ejemplo, como se determina por aumento o disminución, de una respuesta inmune desencadenada), sobre-regulación o sub-regulación de la transcripción y/o traducción de productos virales seleccionados etc. Además, pueden producirse RSV con posiciones de genes desplazadas y atenuados en los cuales el genoma o antigenoma químérico está modificado adicionalmente por introducción de una o más mutaciones atenuadoras que especifican un fenotipo atenuador. Estas mutaciones pueden ser generadas *de novo* y analizadas en cuanto a sus efectos atenuadores de acuerdo con una estrategia de mutagénesis con diseño racional como las descritas en las referencias anteriormente incorporadas. Alternativamente, las mutaciones atenuadoras pueden ser identificadas en un RSV mutante derivado biológicamente y después incorporadas en el RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención.

65 Las mutaciones atenuadoras en RSV derivados biológicamente para incorporación dentro de una cepa para vacuna del RSV con posiciones de genes desplazadas pueden presentarse naturalmente o pueden ser introducidas en cepas del RSV de tipo silvestre por procedimientos de mutagénesis bien conocidos. Por ejemplo, pueden producirse cepas del RSV parentales incompletamente atenuadas mutagénesis química durante el crecimiento del virus en cultivos

de células a los cuales se ha añadido un mutágeno químico, por selección de virus que se han sometidos a pases a temperaturas sub-óptimas con el fin de introducir mutaciones de restricción del crecimiento, o por selección de un virus mutagenizado que produce placas pequeñas (sp) en cultivo de células, como se describe generalmente en la presente memoria y en la Patente de EE.UU. N° 5.922.326, expedida el 13 de julio de 1999.

5 Por "RSV derivado biológicamente" se quiere decir cualquier RSV no producido por medios recombinantes. Por tanto, los RSV derivados biológicamente incluyen los RSV que existen de modo natural de todos los subgrupos y cepas, que incluyen, por ejemplo, los RSV que existe de modo natural que tienen una secuencia genómica de tipo silvestre y RSV que tienen variaciones genómicas de una secuencia del RSV de tipo silvestre de referencia, 10 por ejemplo, RSV que tiene una mutación que especifica un fenotipo atenuado. Análogamente, los RSV derivados biológicamente incluyen RSV mutantes derivados de una cepa del RSV parental, por entre otros medios, mutagénesis artificial y métodos de selección.

15 Para producir un RSV atenuado satisfactoriamente a partir de cepas derivadas biológicamente, se introducen mutaciones preferiblemente en una cepa parental que ha sido incompletamente o parcialmente atenuada, tales como los mutantes ts-1 o ts-1NG o cpRSV de la cepa A2 del subgrupo A del RSV, o sus derivados o subclones. Usando estas y otras cepas parcialmente atenuadas pueden generarse mutación(es) adicional(es) que atenúan más las cepas, por ejemplo, hasta un nivel deseado de replicación restringida en un mamífero hospedante, al mismo tiempo que retienen suficiente inmunogenicidad para conferir protección a los individuos vacunados.

20 20 Los mutantes parcialmente atenuados del virus del subgrupo A o B puede ser producidos por métodos bien conocidos de clonar biológicamente virus de tipo silvestre en un sustrato celular aceptable y desarrollar, por ejemplo, sus mutantes por pases en frío, sometiendo el virus a mutagénesis química para producir mutantes ts, o seleccionando mutantes de pequeñas placas o mutantes fenotípicos similares (véase, por ejemplo, Murphy *et al.*, publicación de patente internacional WO 93/21310). Para virus del subgrupo B, un virus parental parcialmente atenuado ilustrativo es cp 23, que es un mutante de la cepa B1 del subgrupo B.

25 30 Pueden combinarse diversas técnicas de selección conocidas para producir mutantes parcialmente atenuados a partir de cepas del subgrupo A o B no atenuadas que son útiles para una derivatización adicional como se describe en la presente memoria. Además, las mutaciones que especifican fenotipos atenuados pueden ser introducidas individualmente o en combinación en virus de los subgrupo A o B incompletamente atenuados para producir virus para vacunas que tienen mutaciones atenuadoras múltiples y definidas que les confieren un nivel deseado de atenuación e inmunogenicidad en individuos vacunados.

35 40 Como se ha indicado anteriormente la producción de un mutante del RSV suficientemente atenuado y derivado biológicamente puede conseguirse por varios métodos conocidos. Uno de tales métodos implica someter un virus parcialmente atenuado a pases en cultivo de células a temperaturas atenuantes progresivamente menores. Por ejemplo, mientras que el virus de tipo silvestre se cultiva típicamente a aproximadamente 34-37°C, los mutantes parcialmente atenuados se producen por pases en cultivos de células (por ejemplo, células de riñón de bovino primarias) a temperaturas subóptimas, por ejemplo, 20-26°C. Por tanto, la cepa cp mutante u otra parcialmente atenuada, por ejemplo, ts-1 o cpRSV, es adaptada a un crecimiento eficaz a una temperatura inferior por pases en MRC-5 o células Vero, a una temperatura de aproximadamente 20-24°C, preferiblemente 20-22°C. Esta selección del RSV mutante durante los pases en frío reduce sustancialmente cualquier virulencia residual en las cepas derivadas en comparación con la cepa parental parcialmente atenuada.

45 50 Alternativamente, pueden introducirse mutaciones específicas en RSV derivados biológicamente sometiendo un virus parental parcialmente atenuado a mutagénesis química, por ejemplo, para introducir mutaciones ts o, en el caso de los virus que ya son ts, más mutaciones ts suficientes para conferirle mayor atenuación y/o estabilidad del fenotipo ts del derivado atenuado. Los medios para la introducción de las mutaciones ts en RSV incluyen replicación del virus en presencia de un mutágeno, tal como 5-fluorouridina o 5-fluorouracilo en una concentración de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-5} M, preferiblemente de alrededor de 10^{-4} M, exposición del virus a nitrosoguanidina a una concentración de aproximadamente 100 µg/ml, de acuerdo con el método general descrito en, por ejemplo, (Gharpure *et al.*, *J. Virol.*, 3:414-421, 1969 y Richardson *et al.*, *J. Med. Virol.*, 3:91-100, 1978), o introducción genética de mutaciones ts específicas. También pueden usarse otros mutágenos químicos. La atenuación puede resultar de una mutación ts en casi cualquiera de los genes del RSV, aunque una diana particularmente alcanzable para este fin se ha encontrado en el gen de la polimerasa (L).

60 65 El nivel de sensibilidad a la temperatura de replicación en el RSV atenuado ilustrativo para uso dentro de la invención se determina comparando su replicación a una temperatura permisiva con la atenuación a varias temperaturas restrictivas. La temperatura más baja a la cual la replicación del virus se reduce 100 veces o más en comparación con su replicación a la temperatura permisiva se denomina temperatura de corte (*shutoff*). En animales experimentales y seres humanos, tanto la replicación como la virulencia del RSV están correlacionadas con la temperatura de corte de los mutantes. La replicación de mutantes con una temperatura de corte de 39°C está moderadamente restringida, mientras que mutantes con una temperatura de corte de 38°C se replican menos bien y los síntomas de la enfermedad se mantienen restringidos al tracto respiratorio superior. Un virus con una temperatura de corte de 35°C a 37°C estará totalmente atenuado en chimpancés y sustancialmente atenuado en seres humanos. Por tanto, los RSV con posiciones de genes desplazadas, mutantes atenuados y derivados biológicamente como los descritos en la presente memoria que son ts tendrán una temperatura de corte en el intervalo de aproximadamente 35°C a 39°C, y preferiblemente de 35°C a

38°C. La adición de una mutación *ts* a una cepa parcialmente atenuada produce un virus múltiplemente atenuado útil dentro de las composiciones de vacunas descritas en la presente memoria.

Se ha desarrollado cierto número de cepas del RSV atenuados como vacunas candidatas para la administración intranasal usando múltiples rondas de mutagénesis química para introducir múltiples mutaciones en un virus que ya había sido atenuado durante el pase en frío (por ejemplo, Connors *et al.*, *Virology*, 208: 478-484, 1995; Crowe *et al.*, *Vaccine*, 12: 691-699, 1994; y Crowe *et al.*, *Vaccine*, 12: 783-790, 1994). Las evaluaciones en roedores, chimpancés, adultos y bebés indican que algunas de estas cepas de vacunas candidatas son relativamente estables genéticamente, son altamente inmunógenas, y pueden estar satisfactoriamente atenuadas. El análisis de las secuencias de nucleótidos de algunos de estos virus atenuados indica que cada nivel de mayor atenuación está asociado con sustituciones específicas de nucleótidos y aminoácidos. Las referencias de la técnica anterior citada describen también como distinguir habitualmente entre mutaciones incidentales silenciosas y las responsables de las diferencias fenotípicas introduciendo las mutaciones, separadamente y en diversas combinaciones, en el genoma o antigenoma de clones del RSV infecciosos. Este proceso acoplado con la evaluación de las características fenotípicas del virus parental y derivado identifica las mutaciones responsables de tales características deseadas, como atenuación, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, tamaño de placa pequeño, de restricción de la gama de hospedantes, etc.

Las mutaciones así identificadas se compilan en un "menú" y luego se introducen según se deseé, solas o en combinación, para calibrar un virus para vacuna del RSV con posiciones de genes desplazadas hasta un nivel apropiado de atenuación, inmunogenicidad, resistencia genética a la reversión desde un fenotipo atenuado, etc., según se deseé. Preferiblemente, los RSV quiméricos como los descritos en la presente memoria están atenuados por incorporación de al menos una, y más preferiblemente dos o más, mutaciones atenuadoras identificadas de dicho menú, que puede ser definido como un grupo de mutaciones conocidas dentro de un panel de cepas del RSV mutantes derivados biológicamente. Los paneles preferidos de cepas del RSV mutantes descritas en la presente memoria son mutantes sometidos a pases en frío (*cp*) y/o sensibles a la temperatura (*ts*), por ejemplo un panel constituido por mutantes del RSV denominados: cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), y RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579) (cada uno depositado de acuerdo con las normas del Tratado de Budapest en *The American Type Culture Collection* (ATCC) de 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., y a los que se asignaron los números de acceso anteriormente identificados).

A partir de este panel ilustrativo se proporciona un gran menú de mutantes derivados biológicamente, que puede(n) cada uno ser combinados(s) con cualesquiera mutación(es) dentro del panel para calibrar el nivel de atenuación en un RSV recombinante con posiciones de genes desplazadas para uso en vacunas. Pueden ser derivadas mutaciones adicionales a partir del RSV que tienen mutaciones atenuadoras que no son *no ts* y ni *cp* como los identificados, por ejemplo, en cepas mutantes de placas pequeñas (*sp*), adaptadas al frío (*ca*) o restringidas en la gama de hospedantes (*hr*). Las mutaciones atenuadoras pueden ser seleccionadas en porciones codificadoras de un gen del RSV donante o receptor o en regiones no codificadoras, tales como una secuencia reguladora *cis*. Por ejemplo, las mutaciones atenuadoras pueden incluir cambios de bases sencillos o múltiples en una secuencia de comienzo de gen, como se ilustra por una sustitución de bases en la secuencia de comienzo del gen M2 en el nucleótido 7605.

Los RSV con posiciones de genes desplazadas diseñados y seleccionados para uso en vacuna frecuentemente tienen al menos dos y a veces tres o más mutaciones atenuadoras para conseguir un nivel satisfactorio de atenuación para un amplio uso clínico. En un aspecto de esta descripción, al menos una mutación atenuadora está presente en el gen de la RSV polimerasa (bien sea en el gen donante o en receptor) e implica una sustitución de nucleótidos que especifica un cambio de aminoácidos en la proteína polimerasa que especifica un fenotipo sensible a la temperatura (*ts*). Los RSV ilustrativos con posiciones de genes desplazadas en este contexto incorporan una o más sustituciones de nucleótidos en el gen L grande de la polimerasa L, dando como resultado un cambio de aminoácidos en los aminoácidos Asn 43, Phe 521, Gln 831, Met 1169, o Tyr 1321, como se ilustra por los cambios, Leu por Phe 521, Leu por Gln 831, Val por Met 1169, y Asn por Tyr 1321. Alternativamente o adicionalmente, los RSV con posiciones de genes desplazadas como los descritos en la presente memoria pueden incorporar una mutación *ts* en un gen del RSV diferente, por ejemplo, en el gen M2. Preferiblemente, se incorporan dos o más cambios de nucleótidos en un codón que especifican una mutación atenuadora, por ejemplo, en un codón que especifican mutación *ts*, disminuyendo con ello la probabilidad de reversión desde un fenotipo atenuado.

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, pueden ser construidos y caracterizados fácilmente RSV con posiciones de genes desplazadas que incorporan al menos uno y hasta un complemento completo de mutaciones atenuadoras presentes dentro de un panel de cepas del RSV mutante derivadas biológicamente. Por tanto, las mutaciones pueden ser ensambladas en cualquier combinación a partir de un panel seleccionado de mutantes, por ejemplo, cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), y RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579). De este modo, la atenuación de candidatos para vacunas recombinantes puede ser calibrada finalmente para uso en uno o más clases de pacientes, incluyendo bebés seronegativos.

En aspectos más específicos de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas para uso en vacunas incorporan al menos uno y hasta un complemento completo de mutaciones atenuadoras que especifican una sustitución de aminoácidos sensible a la temperatura y/o atenuadora en Asn 43, Phe 521, Gln 831, Met 1169 o Tyr 1321 en el gen

ES 2 317 914 T3

L de la RSV polimerasa, o una sustitución de nucleótidos sensible a la temperatura en la secuencia de comienzo de gen del gen M2. Alternativamente o adicionalmente, los RSV con posiciones de genes desplazadas pueden incorporar al menos uno y hasta un complemento completo de mutaciones de RSV atenuados sometidos a pases enfrió, por ejemplo una o más mutaciones que especifican una de sustitución de aminoácidos en Val 267 en el gen N del RSV, Glu 218 o Thr 523 en el gen F del RSV, Cys 319 o His 1690 en gen L del RSV polimerasa.

- En otros aspectos detallados, el RSV con posiciones de genes desplazadas de la invención se modifica adicionalmente para incorporar mutaciones atenuadoras seleccionadas de: (i) un panel de mutaciones que especifican sustituciones de aminoácidos sensibles a la temperatura Gln 831 a Leu, y Tyr 1321 a Asn en el gen L del RSV polimerasa; (ii) una sustitución de nucleótidos sensible a la temperatura en la secuencia de comienzo de gen del gen M2; (iii) un panel atenuador de mutaciones adoptadas a partir del RSV sometidos a pases en frío que especifican las sustituciones de aminoácidos Val 267 a Ile en el gen N del RSV, y Cys 319 a Tyr y His 1690 a Tyr en el gen L del RSV polimerasa; o (iv) delección o eliminación de la expresión de uno o más de los genes SH, NS1, NS2, G y M2-2 del RSV. Preferiblemente, estos y otros ejemplos del RSV con posiciones de genes desplazadas incorporan al menos dos mutaciones atenuadoras adoptadas a partir del RSV mutante derivado biológicamente, que puede ser derivado de la misma o de diferentes cepas del RSV mutante derivado biológicamente. También preferiblemente, estos mutantes ilustrativos tienen una o más de sus mutaciones atenuadoras estabilizadas por múltiples cambios de nucleótidos en un codón que especifica la mutación.
- De acuerdo con la descripción anterior, la capacidad para producir RSV infecciosos a partir de cDNA permite la introducción de cambios, por ingeniería genética, específicos dentro de los RSV con posiciones de genes desplazadas. En particular, se emplean RSV recombinante e infecciosos, para la identificación de mutación(es) específica(s) en cepas del RSV atenuadas derivadas biológicamente, por ejemplo mutaciones que especifican ts, ca, att y otros fenotipos. Las mutaciones deseadas se identifican así y se introducen en cepas para vacunas del RSV recombinante con posiciones de genes desplazadas. La capacidad de producir virus a partir de cDNA permite la incorporación habitual de estas mutaciones, individualmente o en diversas combinaciones seleccionadas, en un clon de cDNA de longitud completa, después de lo cual serán fácilmente determinados los fenotipos de los virus recombinante rescatados que contienen las mutaciones introducidas.
- Por identificación e incorporación de mutaciones derivadas biológicamente específicas asociadas con fenotipos deseados, por ejemplo, un fenotipo cp o ts, en clones del RSV químicos infecciosos, pueden introducirse otras modificaciones específicas de sitio en, o dentro de, estrecha proximidad, de la mutación identificada. Aunque la mayoría de las mutaciones atenuadoras producidas en RSV derivados biológicamente RSV son cambios de un solo nucleótido, otras mutaciones “específicas de sitio” pueden incorporarse también por técnicas recombinantes en RSV derivados biológicamente o recombinantes. Tal como se usa en la presente memoria, las mutaciones específicas de sitio incluyen inserciones, sustituciones, delecciones o transposiciones de desde 1 a 3, hasta aproximadamente 5-15 o más nucleótidos alterados (por ejemplo, alterados desde una secuencia del RSV de tipo silvestre, desde una secuencia de una cepa RSV mutante seleccionada o desde un clon del RSV recombinante parenteral sometido a mutagénesis). Dichas mutaciones específicas de sitio pueden ser incorporadas, en, o dentro de, la región de una mutación derivada biológicamente seleccionada. Alternativamente, las mutaciones pueden ser introducidas en otros diversos contextos dentro de un clon del RSV, por ejemplo en o cerca de una secuencia reguladora de acción cis o secuencia de nucleótidos que codifica un sitio activo de proteína, un sitio de unión, un epítopo inmunógeno, etc. Los mutantes del RSV específicos de sitio típicamente retienen un fenotipo atenuador deseado, pero pueden exhibir adicionalmente características fenotípicas alteradas no relacionadas con la atenuación, por ejemplo, una inmunogenicidad potenciada o ensanchada, y/o un crecimiento mejorado. Otros ejemplos de mutantes específicos de sitio deseados incluyen RSV recombinantes diseñados para incorporar mutaciones de nucleótidos estabilizantes adicionales en un codón que especifica un mutación atenuadora. Cuando sea posible se introducen dos o más sustituciones de nucleótidos en codones que especifican cambios atenuantes de aminoácidos en un clon del RSV mutante o recombinante parental, lo que proporciona un RSV derivado biológicamente o recombinante que tiene resistencia genética a la reversión a partir de un fenotipo atenuado.
- En otras realizaciones, las sustituciones, adiciones, delecciones o transposiciones de nucleótidos específicas de sitio se introducen aguas arriba (dirección N-terminal) o aguas abajo (dirección C-terminal), por ejemplo, desde 1 a 3, 5-10 y hasta 15 nucleótidos o más 5' o 3', con respecto a la posición del nucleótido diana, por ejemplo, para construir o eliminar un elemento de acción reguladora cis existente.
- Además de las mutaciones puntuales sencillas y múltiples y de las mutaciones específicas de sitio, los cambios en RSV con posiciones de genes desplazadas descritos en la presente memoria incluyen delecciones, inserciones, sustituciones o transposiciones de genes o segmentos de genoma enteros. Estas mutaciones pueden alterar pequeños números de bases (por ejemplo, de 15-30 bases, hasta 35-50 bases o más), grandes bloques de nucleótidos (por ejemplo, 50-100, 100-300, 300-500, 500-1.000 bases), o genes casi completos o completos (por ejemplo, 1.000-1.500 nucleótidos, 1.500-2.500 nucleótidos, 2.500-5.000 nucleótidos, 5.000-6.500 nucleótidos o más) en el genoma o antigenoma donador o receptor, dependiendo de la naturaleza del cambio (es decir, puede ser cambiado un pequeño número de bases para insertar o eliminar un epítopo inmunógeno o cambiar un pequeño segmento de genoma, mientras que grandes bloque(s) de bases están implicados cuando son añadidos, sustituidos, deletreados o transpuestos genes o grandes segmentos de genoma).
- En aspectos alternativos de esta descripción, los RSV con posiciones de genes desplazadas e infecciosos producidos a partir de un genoma o antigenoma expresado por cDNA pueden ser cualesquier de las cepas del RSV o similares al RSV, por ejemplo, humano, bovino, murino, etc., o de cualquier neumovirus, por ejemplo, virus de la neumonía de

ratones, neumovirus aviar (previamente denominado virus de la rinotraqueitis de pavos). Para engendrar una respuesta inmune protectora, la cepa del RSV puede ser una que sea endógena al sujeto que se inmuniza, tal como el RSV humano que se usa para inmunizar seres humanos. El genoma o antigenoma del RSV endógeno puede ser modificado, sin embargo, para expresar genes o segmentos de genoma del RSV a partir de una combinación de diferentes fuentes, 5 por ejemplo, una combinación de genes o segmentos de genoma de diferentes especies, subgrupos o cepas del RSV o de un RSV y otro patógeno respiratorio, tal como PIV.

La introducción de las mutaciones antes definidas en un clon del RSV con posiciones de genes desplazadas e 10 infeccioso puede conseguirse por una variedad de métodos bien conocidos. Por "clon infeccioso" con respecto al DNA se quiere significar cDNA o su producto, sintético u otro clase, que puede ser transcrita en RNA genómico o antigenómico capaz de servir como molde para producir el genoma de un virus o partícula subviral infeccioso. Por tanto, pueden introducirse mutaciones definidas por técnicas convencionales (por ejemplo, mutagénesis dirigida 15 a un sitio) en una copia de cDNA del genoma o antigenoma. El uso de sub-fragmentos de cDNA de antigenoma o genoma para ensamblar un cDNA de antigenoma o genoma completo como se describe en la presente memoria tiene la ventaja que cada región puede ser manipulada separadamente (los cDNA más pequeños son más fáciles de manipular 20 que los grandes) y luego se ensamblan fácilmente en un cDNA completo. Por tanto, el cDNA del antigenoma o genoma completo, o cualquiera de sus sub-fragmentos, pueden usarse como molde para la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Esto puede ser a través del intermedio de una forma fagémida monocatenaria, tal como usando el kit Muta-gene® kit de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) o un método que usa un plásmido bicatenario directamente 25 como molde, tal como el kit de mutagénesis Chameleon de Stratagene (La Jolla, CA), o la reacción en cadena de la polimerasa que emplea un cebador oligonucleotídico o molde que contiene la(s) mutación(es) de interés. Un sub-fragmento mutado puede ensamblarse luego en el cDNA del antigenoma o genoma completo. Se conocen y están disponibles una variedad de otras técnicas de mutagénesis para uso en producir las mutaciones de interés en el cDNA del antigenoma o genoma del RSV. Las mutaciones pueden variar desde cambios de un solo nucleótido hasta para reemplazar grandes piezas de cDNA que contienen uno o más genes o regiones de genoma.

Por tanto, en un ejemplo se introducen mutaciones usando el kit de mutagénesis de fagémido *in vitro* Muta-gene disponible en Bio-Rad. Dicho brevemente, los cDNA que codifican una porción de un genoma o antigenoma del RSV se clona en el plásmido pTZ 18U, y se usa para transformar las células CJ236 (Life Technologies). Las preparaciones 30 de fagémido se obtienen como lo recomienda el fabricante. Los oligonucleótidos se diseñan para mutagénesis por introducción de un nucleótido alterado en la posición deseada del genoma o antigenoma. El plásmido que contiene el fragmento de genoma o antigenoma genéticamente alterado se amplifica luego y la pieza mutada se reintroduce luego en el clon del genoma o antigenoma de longitud completa.

También se describen en la presente memoria métodos para producir un RSV con posiciones de genes desplazadas, 35 e infeccioso a partir de uno o más polinucleótidos aislados, por ejemplo, uno o más cDNA. De acuerdo con la presente descripción un cDNA que codifica un genoma o antigenoma del RSV se construye por co-expresión intracelular o *in vitro* con las proteínas virales necesarias para formar RSV infeccioso. Por "antigenoma del RSV" se quiere decir una molécula de polinucleótido de sentido positivo aislada que sirve como molde para la síntesis del genoma del 40 RSV progenie. Preferiblemente se construye un cDNA que es una versión de sentido positivo del genoma del RSV, correspondiente al RNA intermedio replicativo, o antigenoma, de modo que se minimice la posibilidad de hibridarse con transcritos de sentido positivo de las secuencias complementarias que codifican las proteínas necesarias para 45 generar una nucleocápsida transcriptora y replicadora, es decir secuencias que codifican las proteínas N, P, L y M2 (ORF1). En un sistema de minigenoma del RSV, el genoma y antigenoma fueron igualmente activos en el rescate, tanto complementados por RSV como por plásmidos, lo que indica que pueden usarse el genoma o antigenoma y por tanto la elección puede hacerse basándose en motivos metodológicos u otros.

Un genoma RSV natural comprende típicamente una molécula de polinucleótido de sentido negativo que, a través 50 de mRNA virales complementarios, codifica once especies de proteínas virales, es decir, las especies no estructurales NS1 y NS2, N, P, de la matriz (M), pequeña proteína hidrófoba (SH), glicoproteína (G), de fusión (F), M2(ORF1), M2(ORF2), y L, sustancialmente como se describe en (Mink *et al.*, *Virology*, 185:615-624, 1991; Stec *et al.*, *Virology*, 183:273-287, 1991; y Connors *et al.*, *Virol.*, 208:478-484, 1995; Collins *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93:81-85, 1996). Para los fines de la presente descripción el genoma o antigenoma del RSV recombinante de la invención solamente necesitaba contener aquellos genes o sus porciones necesarias para convertir en infecciosas a las partículas virales 55 o subvirales codificadas de este modo infecciosas. Además, los genes o sus porciones pueden ser proporcionados por más de una molécula de polinucleótido, es decir, un gen puede ser proporcionado por complementación o similar a partir de una molécula de nucleótido separada, o puede ser expresado directamente a partir del cDNA del genoma o antigenoma.

60 Por RSV recombinante se quiere decir un RSV o partícula viral o subviral similar a RSV derivado directamente o indirectamente de un sistema de expresión recombinante o propagado a partir de virus o partículas subvirales producidas de los mismo. El sistema de expresión recombinante empleará un vector de expresión recombinante que comprende una unidad transcripcional unida operativamente que comprende un conjunto de al menos un elemento o elementos genéticos que tienen papel regulador en la expresión del gen del RSV, por ejemplo, un promotor, una secuencia estructural o codificadora que se transcribe en RNA del RSV, y secuencias apropiadas de iniciación y de terminación de la transcripción.

ES 2 317 914 T3

Para producir RSV infecciosos a partir de genoma o antigenoma expresado por cDNA, el genoma o antigenoma se co-expresa con las proteínas del RSV necesarias para: (i) producir una nucleocápsida capaz de replicación de RNA, y (ii) convertir a las nucleocápsidas de la progenie en competentes tanto para la replicación como para la transcripción del RNA. La transcripción por la nucleocápsida del genoma proporciona las otras proteínas del RSV e inicia una 5 infección productiva. Alternativamente, las proteínas del RSV adicionales necesitadas para una infección productiva pueden suministrarse por co-expresión.

Un antigenoma del RSV puede ser construido para uso de acuerdo con esta descripción ensamblando segmentos de 10 cDNA clonado, que representan en agregado el antigenoma completo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); descrita en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.683.195 y 4.683.202, y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, 1990) de copias transcritas inversamente de mRNA del RSV o de RNA de genoma. Por ejemplo, los cDNA que contienen el extremo del lado izquierdo del antigenoma, que 15 se extiende desde un promotor apropiado (por ejemplo, promotor de RNA polimerasa de T7) y el complemento de la región delantera para el gen SH, se ensamblan en un vector de expresión apropiado, tal como un plásmido (por ejemplo, pBR322) o diversos vectores cósmidos, fagos o vectores de virus de DNA disponibles. El vector puede ser modificado por mutagénesis y/o inserción de un fragmento polienlazador sintético que contiene sitios de restricción únicos diseñados para facilitar el ensamblamiento. Por ejemplo, un vector plásmido descrito en la presente memoria fue derivado de pBR322 por reemplazo del fragmento PstI-EcoRI con un DNA sintético que contenía sitios de enzimas de restricción convenientes. El uso de pBR322 como un vector estabilizó los nucleótidos 3716-3732 de la secuencia 20 del RSV, que de otro modo mantenía delecciones o inserciones de nucleótidos, y la propagación del plásmido en la cepa bacteriana DH10B para evitar una duplicación artificial y la inserción que de otro modo ocurriría en la proximidad del nt 4499. Por facilidad de preparación los genes G, F y M2 pueden ensamblarse en un vector separado, como 25 puede ser las secuencias de L y trasera. El extremo del lado derecho (por ejemplo, la secuencias L y trasera) del plásmido del antigenoma puede contener secuencias adicionales según se deseé, tales como una ribozima flanqueante y terminadores de la transcripción de T7 en tandem. El ribozima puede ser de tipo cabeza de martillo (por ejemplo, Grosfeld *et al.*, *J. Virol.*, 69:5677-5686, 1995), que proporcionaría un extremo 3' que contiene un solo nucleótido no viral o puede ser cualquiera de otros ribozimas adecuados, tales como el del virus delta de la hepatitis (Perrotta *et al.*, *Nature* 350:434-436, 1991) que proporcionaría un extremo 3' libre de nucleótidos que no son del RSV. Un segmento de la parte central (por ejemplo, la pieza G a M2) está insertado en un sitio de restricción apropiado del plásmido parte 30 delantera-a-SH, que a su vez es el receptor para la pieza L-parte trasera-ribozima-terminador, que proporciona un antigenoma completo. En un ejemplo ilustrativo descrito en la presente memoria, el extremo delantero se construyó apoyándose en el promotor para la RNA polimerasa de T7 que incluía tres residuos G transcritos para la actividad óptima; la transcripción dona estos tres G no virales al extremo 5' del antigenoma. Estos tres residuos G no virales pueden ser omitidos para proporcionar un extremo 5' libre de nucleótidos no virales. Para generar un extremo 3' casi 35 correcto, el extremo trasero se construyó para estar adyacente a un ribozima de tipo cabeza de martillo que por escisión donaría un solo residuo U 3'-fosforilado al extremo 3' del RNA codificado.

En ciertos aspectos de esta descripción, las secuencias complementarias que codifican las proteínas necesarias para 40 generar una nucleocápsida del RSV transcriptora y replicadora son proporcionadas por uno o más virus coadyuvantes. Dichos virus coadyuvantes pueden ser de tipo silvestre o mutante. Preferiblemente, el virus coadyuvante puede ser 45 distinguido fenotípicamente de los virus codificados por el cDNA del RSV. Por ejemplo, es deseable proporcionar anticuerpos monoclonales que reaccionen inmunológicamente con el virus coadyuvante pero no con el virus codificado por el cDNA del RSV. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos neutralizantes. En algunos aspectos, los anticuerpos pueden ser usados para neutralizar el fondo del virus coadyuvante para facilitar la identificación y recuperación del virus recombinante, o en cromatografía de afinidad separar el virus coadyuvante del virus recombinante. En el cDNA del RSV pueden ser introducidas mutaciones que hagan al RSV recombinante no reactivo o resistente a la neutralización con dichos anticuerpos.

Puede realizarse una variedad de inserciones y delecciones de nucleótidos en el genoma o antigenoma del RSV 50 con posiciones de genes desplazadas para generar un clón apropiadamente atenuado: La longitud en nucleótidos del genoma del RSV de tipo silvestre humano (15.222 nucleótidos) es un múltiplo de seis, y los miembros de los géneros Paramyxovirus y Morbillivirus serigen por una "regla de seis", es decir, los genomas (o minigenomas) se replican eficazmente sólo cuando su longitud en nucleótidos es un múltiplo de seis (se piensa que es un requerimiento para el espaciamiento preciso de los residuos de nucleótidos con respecto a la proteína NP encapsidante). La alteración de la 55 longitud del genoma del RSV en incrementos de un solo residuo no tuvo efectos sobre la eficacia de la replicación, y el análisis de secuencias de varios mutantes de minigenomas diferentes después de pases mostró que las diferencias de longitud se mantenían sin cambios compensatorios. Por tanto, el RSV carece del estricto requerimiento de que la longitud del genoma sea un múltiplo de seis, y pueden hacerse inserciones y delecciones de nucleótidos en el genoma o antigenoma del RSV sin impedir la replicación del RSV recombinante de la presente invención.

60 Los medios alternativos para construir cDNA que codifican un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas incluyen transcripción inversa-PCR usando condiciones de PCR mejoradas (por ejemplo, como se describe en Cheng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5695-5699, 1994; Samal *et al.*, *J. Virol.*, 70:5075-5082, 1996) para reducir el número de componentes de cDNA sub-unitarios hasta tan poco como una o dos piezas. En otros 65 aspectos pueden usarse promotores diferentes (por ejemplo, T3, SP6) o ribozimas diferentes (por ejemplo, que la del virus delta de la hepatitis). Pueden usarse vectores de DNA diferentes (por ejemplo, cósmidos) para la propagación para acomodar mejor el genoma o antigenoma de tamaño grande.

Las proteínas N, P y L necesarias para replicación de RNA, requieren un factor de prolongación de RNA polimerasa, tal como la proteína M2(ORF1) para la transcripción procesadora. Por tanto, se requiere M2(ORF1) o un factor de prolongación sustancialmente equivalente para los virus de RNA de cadena negativa para la producción del RSV infecciosos y es un componente necesario de nucleocápsidas funcionales durante la infección productiva.

5 La necesidad de la proteína M2(ORF1) es consistente con su papel como factor de prolongación de la transcripción. La necesidad para la expresión de la proteína factor de prolongación de RNA polimerasa para virus de RNA de cadena negativa es un aspecto de la presente invención. M2(ORF1) puede ser suministrada por expresión del gen M2 completo, bien sea por el genoma o antigenoma químérico o bien sea por co-expresión con él, aunque en esta forma el segundo
10 ORF2 también puede ser expresado y tener un efecto inhibidor en la replicación de RNA. Por tanto, para la producción de virus infecciosos que usan el gen M2 completo las actividades de los dos ORF deben ser equilibradas para permitir suficiente expresión de M2(ORF1) para proporcionar actividad de prolongación de la transcripción pero no tanta de M2(ORF2) que inhiba la replicación del RNA. Alternativamente, la proteína ORF1 es proporcionada a partir de un
15 cDNA manipulado para carecer de ORF2 o que codifica una ORF2 defectuosa. La eficacia de la producción de virus también puede ser mejorada por co-expresión de genes de proteínas virales adicionales, tales como los que codifican constituyentes de la envoltura (es decir, las proteínas SH, M, G y F).

De acuerdo con estos resultados concernientes a M2(ORF2), se proporciona otro aspecto ilustrativo de esta descripción que comprende un RSV con posiciones de genes desplazadas que incorpora una mutación de M2(ORF2) (Collins y Wertz, *J. Virol.*, 54:65-71, 1985; Collins *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 71:3015-3020, 1990, Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:81-85; 1996.) para proporcionar nuevos candidatos de vacunas del RSV (véase la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/143.097, presentada por Collins *et al.*, el 9 de julio de 1999). En ciertos aspectos, la expresión de M2ORF2 es reducida o eliminada modificando el genoma o antigenoma del RSV recombinante para incorporar una mutación de desplazamiento de marco o uno o varios codones de parada en M2ORF2 que proporcionan un clon viral desactivado ("knock out"). Alternativamente, M2 ORF2 está delecionado por completo o en parte para hacer a la proteína M2-2 parcialmente o enteramente no funcional o para interrumpir su expresión conjuntamente para proporcionar un RSV químérico "mutante por delección" de M2ORF2. Alternativamente, el M2-2ORF puede ser transpuesto en el genoma o antigenoma hasta una posición más próxima al promotor o una posición más distante al promotor comparada con la posición natural de orden de gen del gen M2-2 para sobre-regular o sub-regular la expresión del M2-2ORF. En aspectos adicionales, el M2-2ORF es incorporado en el genoma o antigenoma como un gen separado que tiene una señal de comienzo de gen y una señal de fin de gen, cuya modificación da como resultado la sobre-regulación del M2-2ORF.

35 Los RSV con posiciones de genes desplazadas descritos en la presente memoria que incorporan mutaciones en M2ORF2 poseen características fenotípicas altamente deseables para el desarrollo de vacunas. Las modificaciones anteriormente identificadas en el genoma o antigenoma recombinante especifican uno o más cambios fenotípicos deseados en el virus o partícula subviral resultante. Se generan por tanto candidatos para vacunas que exhiben una o más características identificadas como: (i) un cambio en la del transcripción mRNA, (ii) un cambio en el nivel de expresión de proteína viral; (iii) un cambio en la replicación de RNA genómico o antigenómico, (iv) un cambio en las características de crecimiento viral, (v), un cambio en el tamaño de la placa viral, y/o (vi) un cambio en la citopatogenicidad.

En los recombinantes del RSV ilustrativos que incorporan una mutación por delección o desactivación de M2ORF2, los cambios fenotípicos deseados incluyen atenuación del crecimiento viral comparado con el crecimiento de una cepa del RSV de tipo silvestre o parental mutante correspondiente. En más aspectos detallados, el crecimiento viral en 45 cultivo de células puede ser atenuado en aproximadamente 10 veces o más atribuible a mutaciones en M2ORF2. La cinética de crecimiento viral también se muestra que se modifica de una manera que es beneficiosa para el desarrollo de vacunas.

También se describen en la presente memoria RSV mutantes con delección y desactivación de M2ORF2 que exhiben 50 una cinética retrasada de la síntesis de mRNA viral comparada con la cinética de la síntesis de mRNA de cepas del RSV de tipo silvestre o parental mutante correspondiente: A pesar de esta cinética de transcripción retrasada, estos nuevos candidatos para vacunas exhiben un aumento en la síntesis de RNA acumulativa comparado con el virus parental. Estos cambios fenotípicos están asociados típicamente a un aumento de la acumulación de proteína viral en células infectadas comparado con la acumulación de proteínas en células infectadas con cepas del RSV de tipo silvestre u otras parentales. Al mismo tiempo, la replicación de RNA viral se reduce en RSV con posición desplazada del gen 55 M2ORF2 comparada con la de una cepa RSV parental que tiene la función de M2ORF2 normal, con lo cual se reduce la acumulación de RNA genómico o antigenómico.

Dentro de aspectos preferidos de esta descripción, los RSV químéricos con delección y desactivación de M2ORF2 60 son manipulados para expresar niveles no disminuidos o, más típicamente, aumentados de antígeno(s) viral(es) mientras que también exhiben un fenotipo atenuado. El potencial inmunógeno se conserva por tanto debido a la transcripción de mRNA y expresión de antígenos no disminuida o aumentada, mientras que la atenuación se consigue por la incorporación de el (los) gen(es) o segmento(s) de gen(es) heterólogo(s) y reducciones concomitantes en la replicación de RNA y el crecimiento de virus atribuibles a la mutación por delección y desactivación de M2ORF 2. Este nuevo 65 conjunto de rasgos fenotípicos es altamente deseado para desarrollo de vacunas. Otros cambios fenotípicos útiles que se observan en RSV con posiciones de genes desplazadas y delección y desactivación de M2ORF2 incluyen un fenotipo de placas grandes y una cipatogenicidad alterada comparada con las cepas del RSV de tipo silvestre o parental mutante correspondientes.

Los polinucleótidos aislados (por ejemplo, cDNA) que codifican un genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas y, separadamente, o en cis, o expresadas a partir del cDNA del antigenoma o genoma, las proteínas N, P, L y M2(ORF1), se insertan por transfección, electroporación, inserción mecánica, transducción o similares, en células que son capaces de soportar una infección por RSV productiva, por ejemplo, células HEp-2, FRhL-DBS2, 5 MRC y Vero. La transfección de secuencias de polinucleótido aisladas puede ser introducidas en células cultivadas por, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et al.*, *Cell*, 14:725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics*, 7:603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology*, 52:456, 1973), electroporación (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1:841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.*, (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987, transfección mediada por lípidos catiónicos (Hawley-Nelson 10 *et al.*, *Focus* 15:73-79, 1993) o un reactivo de transfección comercialmente disponible, por ejemplo, LipofectACE® (Life Technologies).

Las proteínas N, P, L y M2(ORF1) están codificadas por uno o más cDNA y vectores de expresión que pueden 15 ser los mismos o separados de los que codifican el genoma o antigenoma, y sus diversas combinaciones. Si se desea pueden ser incluidas proteínas adicionales, codificadas por su propio vector o por un vector que codifica una proteína N, P, L, o M2 (ORF1) y/o el genoma o antigenoma completo. La expresión del genoma o antigenoma y proteínas a partir de plásmidos transfectados puede conseguirse, por ejemplo, por cada cDNA que esté bajo el control de un promotor para la RNA polimerasa de T7, que a su vez es suministrado por infección, transfección o transducción con 20 un sistema de expresión para la RNA polimerasa de T7, por ejemplo, un recombinante de la cepa MVA del virus vacinia que expresa la RNA polimerasa de T7 (Wyatt *et al.*, *Virology*, 210:202-205, 1995). Las proteínas virales, y/o la RNA polimerasa de T7 también puede ser proporcionadas a partir de células de mamífero transformadas, o por transfección de mRNA preformado o proteína.

Alternativamente, la síntesis de antigenoma o genoma puede realizarse *in vitro* (exento de células) en una reacción 25 de transcripción-traducción combinada, seguido por transfección en células. O bien el RNA del antigenoma o genoma puede ser sintetizado *in vitro* y transfectado en células que expresan proteínas del RSV.

Los virus candidatos de vacunas pueden ser seleccionados de acuerdo con los criterios de viabilidad, atenuación 30 e inmunogenicidad, siguiendo métodos muy conocidos. Los virus que serán más deseados en vacunas deben mantener la viabilidad, tener un fenotipo de atenuación estable, exhibir replicación en un hospedante inmunizado (aunque sea a niveles inferiores), y desencadenar eficazmente la producción de una respuesta inmune en un sujeto vacunado suficiente para conferirle protección contra enfermedad grave causada por la infección subsiguiente por virus de tipo silvestre. Claramente, los mutantes de virus RS hasta ahora conocidos y descritos no satisfacen la totalidad de estos criterios. De hecho, contrariamente a las expectativas basadas en los resultados descritos para los RSV atenuados, los 35 virus descritos en la presente memoria no solo son viables y más apropiadamente atenuados que los mutantes previos, sino que son más estables genéticamente *in vivo* que los mutantes previamente estudiados reteniendo la capacidad de estimular una respuesta inmune protectora y en algunos casos expandir la protección proporcionada por modificaciones múltiples, por ejemplo, inducen protección contra cepas o subgrupos virales diferentes, o protección por una base inmunológica diferente, por ejemplo, inmunoglobulinas secretoras frente a serológicas, inmunidad celular y similares. 40 Antes de la presente descripción, la inestabilidad genética del fenotipo *ts* después de la replicación *in vivo* ha sido común para los virus *ts* (Murphy *et al.*, *Infect. Immun.*, 37:235-242, 1982).

Para propagar un virus RS con posiciones de genes desplazadas para uso en vacunas y otros fines, puede usarse cierto número de líneas celulares que permitan el crecimiento del RSV. El RSV crece en una variedad de células 45 humanas y animales. Las líneas celulares preferidas para propagar virus RS atenuados para uso en vacunas incluyen células DBS-FRhL-2, MRC-5, y Vero. Los rendimientos más altos en virus se consiguen usualmente con líneas de células epiteliales, tales como células Vero. Las células son típicamente inoculadas con el virus a una multiplicidad de infección que varía desde aproximadamente 0,001 a 1,0 o más, y son cultivadas en condiciones permisivas para la replicación del virus, por ejemplo, a aproximadamente 30-37°C y durante aproximadamente 3-5 días, o tanto tiempo 50 como sea necesario para que el virus alcance un título adecuado. El virus se retira del cultivo de células y separa de los componentes celulares, típicamente por métodos de clarificación conocidos, por ejemplo, centrifugación, y puede ser purificado adicionalmente si se desea usando métodos bien conocidos en la técnica.

El RSV con posiciones de genes desplazadas que ha sido atenuado y modificado de otra forma como se describe 55 en la presente memoria puede ser ensayado en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos y generalmente aceptados para confirmar la atenuación, la resistencia a la reversión fenotípica y la inmunogenicidad adecuados para uso en vacunas. En ensayos *in vitro*, el virus modificado (por ejemplo, un RSV derivado biológicamente o recombinante y múltiplemente atenuado) se analiza en cuanto a un sensibilidad a la temperatura de replicación del virus, es decir, el fenotipo *ts*, y el fenotipo de placas pequeñas. Los virus modificados se analizan adicionalmente en modelos animales 60 de infección por RSV. Se ha descrito una variedad de modelos animales y se recogen en Meignier *et al.*, eds., *Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infection*, Merieux Foundation Publication, 1991. Un modelo de rata algodón de infección por RSV se describe en la patente de EE.UU 4.800.078 y Prince *et al.*, *Virus Res.*, 3:193-206, 1985, y se considera predictivo de la atenuación y eficacia en primates humanos y no humanos. Además un modelo de primate de infección por RSV que usa el chimpancé es predictivo de la atenuación y eficacia en seres humanos, como se describe 65 con detalle en Richardson *et al.*, *J. Med. Virol.*, 3:91-100, 1978; Wright *et al.*, *Infect. Immun.* 37:397-400, 1982; Crowe *et al.*, *Vaccine*, 11:1395-1404, 1993.

Los sistemas modelos del RSV, incluyendo roedores y chimpancés para evaluar la atenuación e infectividad de candidatos para vacunas del RSV están ampliamente aceptados en la técnica y los datos obtenidos de los mismos se correlacionan bien con la infección por RSV y atenuación. Los modelos de ratón y rata *algodón* son especialmente útiles en aquellos casos en los que los virus RS candidatos presentan un crecimiento inadecuado en chimpancés, por ejemplo en el caso de los virus del subgrupo B del RSV.

De acuerdo con la descripción anterior y basándose los ejemplos que se dan más adelante, también se describen composiciones del RSV con posiciones de genes desplazadas e infecciosas para uso en vacunas. El virus químérico atenuado que es un componente de una vacuna está en una forma aislada y típicamente purificada. "Aislado" se emplea para referirse a RSV que está en otro medio ambiente distinto del natural de un virus de tipo silvestre, tal como la nasofaringe de un individuo infectado. Más generalmente, aislado significa se emplea para incluir el virus atenuado como un componente de una cultivo celular u otro medio artificial en donde puede ser propagado y caracterizado en un estado controlado. Por ejemplo, los RSV atenuados como los descritos en la presente memoria pueden ser producidos por un cultivo celular infectado, ser separados del cultivo celular y añadidos a un estabilizador.

Las vacunas del RSV como las descritas en la presente memoria contienen como ingrediente activo una cantidad inmunógenamente eficaz de un RSV producido como se ha descrito en la presente memoria. El RSV derivado biológicamente o recombinantemente puede ser usado directamente en formulaciones de vacuna, o ser liofilizado. Los virus liofilizados se mantendrán típicamente a aproximadamente 4°C. Cuando estén listos para su uso el virus liofilizado se reconstituye en una solución estabilizadora, por ejemplo, solución salina o una que comprende SPG, Mg⁺⁺ y HEPES, con o sin coadyuvante, como se describe con más detalle más adelante. El virus derivado biológicamente o recombinantemente modificado puede ser introducido en un hospedante con un vehículo y/o coadyuvante fisiológicamente aceptable. Los vehículos útiles son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para uso tal cual, o se liofilizan, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración, como se ha mencionado anteriormente. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para ajuste del pH y tampones, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, y similares. Los coadyuvantes aceptables incluyen coadyuvantes incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, o alumbré, que son materiales bien conocidos en la técnica. Los coadyuvantes preferidos también incluyen Stimulon® QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA), MPL® (3-O-monofofosforil-desacilado-lípido A; Corixa, Hamilton, MT), y interleuquina-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA).

Por inmunización con una composición de vacuna del RSV con posiciones de genes desplazadas como se ha descrito en la presente memoria, vía aerosol, gotitas, oral, tópica u otra vía, el sistema inmune del hospedante responde a la vacuna produciendo anticuerpos específicos para uno o más proteínas del RSV, por ejemplo, las glicoproteínas F y/o G. Como resultado de la vacunación el hospedante llega a ser al menos parcialmente o completamente inmune a la infección por RSV, o resistente a desarrollar enfermedad por RSV de moderada a severa, particularmente del tracto respiratorio inferior.

Las vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas como las descritas en la presente memoria pueden comprender un virus atenuado que desencadena una respuesta inmune contra una sola cepa o subgrupo del RSV, por ejemplo, A o B, o contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. En este contexto, el RSV con posiciones de genes desplazadas puede desencadenar una respuesta inmune monoespecífica o una respuesta inmune poli-específica contra múltiples cepas o subgrupos del RSV. Alternativamente, un RSV con posiciones de genes desplazadas que tiene diferentes características inmunógenas puede ser combinada en una mezcla de vacunas o administrada separadamente en un protocolo de tratamiento coordinado para desencadenar una protección más eficaz contra una cepa del RSV o contra múltiples cepas o subgrupos del RSV.

El hospedante al cual se administra la vacuna puede ser cualquier mamífero susceptible de infección por RSV o un virus estrechamente relacionado y capaz de generar una respuesta inmune protectora contra los antígenos del virus vacunante. Por tanto, los hospedantes adecuados incluyen seres humanos, primates no humanos, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, lagomorfos, redores, etc. Por consiguiente se describen en la presente memoria métodos para crear vacunas para una variedad de usos humanos y veterinarios.

Las composiciones de vacunas que contienen los RSV con posiciones de genes desplazadas atenuado descritos en la presente memoria se administran a un paciente susceptible a, o de otro modo con riesgo de, infección por RSV en una "dosis inmunógenamente eficaz" que es suficiente para inducir o mejorar las capacidades de la respuesta inmune del individuo contra el RSV. En el caso de sujetos humanos, el virus atenuado de la invención se administra de acuerdo con protocolos bien establecidos de vacunación para seres humanos contra el RSV, como se describe en, por ejemplo, Wright *et al.*, *Infect. Immun.* 37:397-400, 1982; Kim *et al.*, *Pediatrics* 52:56-63, 1973; y Wright *et al.*, *J. Pediatr.* 88:931-936, 1976. Dicho brevemente, los adultos o los niños se inoculan intranasalmente mediante gotitas con una dosis inmunógenamente eficaz de vacuna del RSV, típicamente en un volumen de 0,5 ml de un diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. Esto tiene la ventaja de la simplicidad y seguridad comparada con la inmunización parenteral con una vacuna no replicante. También proporciona estimulación directa de la inmunidad local del tracto respiratorio que desempeña un papel importante en la resistencia al RSV. Además, este modo de vacunación evita eficazmente los efectos inmunosupresores de anticuerpos serológicos específicos derivados maternalmente, que típi-

camente se encuentran en los muy jóvenes. Además, aunque la administración parenteral de antígenos del RSV puede estar algunas veces asociada con complicaciones inmunopatológicas, esto nunca se ha observado con un virus vivo.

En todos los sujetos, la cantidad precisa de vacuna del RSV con posiciones de genes desplazadas administrada y el programa de tiempos y repetición de administración se determinará basándose en el estado de salud del paciente y el peso, el modo de administración, la naturaleza de la formulación, etc. Las dosificaciones variarán generalmente desde aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 unidades formadoras de placas (UFP) o más de virus por paciente, más comúnmente desde aproximadamente 10^4 a 10^5 unidades de UFP de virus por paciente. En cualquier caso, las formulaciones de vacuna deben proporcionar una cantidad del RSV atenuado suficiente para estimular o inducir eficazmente una respuesta inmune anti-RSV, por ejemplo, como se puede determinar por fijación de complemento, neutralización de placas, y/o ensayo con inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), entre otros métodos. A este respecto, los individuos se monitorizan también para los signos y síntomas de enfermedad del tracto respiratorio superior. Como con la administración a chimpancés, el virus atenuado de la vacuna crece en la nasofaringe de los individuos vacunados a niveles de aproximadamente 10 o más veces inferiores que el virus de tipo silvestre, o aproximadamente 10 o más veces inferiores cuando se comparan con los niveles del RSV incompletamente atenuados.

En neonatos y bebés, puede requerirse una administración múltiple para desencadenar suficientes niveles de inmunidad. La administración debe comenzar dentro del primer mes vida, y a intervalos a través de la niñez, tales como a los dos meses, seis meses, un año y dos años, según sea necesario para mantener suficientes niveles de protección contra la infección por RSV de tipo natural (tipo silvestre). Similarmente los adultos que sean particularmente susceptibles a infección por RSV, tal como, por ejemplo, trabajadores sanitarios, trabajadores en centros de día, miembros familiares de niños jóvenes, personas mayores, individuos con la función cardiopulmonar comprometida, pueden requerir múltiples inmunizaciones para establecer y/o mantener respuestas inmunes protectoras. Los niveles de inmunidad inducida pueden ser monitorizados midiendo las cantidades de anticuerpos secretores y serológicos neutralizantes, y dosificaciones ajustadas o vacunaciones repetidas según sea necesario para mantener los niveles deseados de protección. Además, diferentes virus para vacunas pueden estar indicados para la administración a diferentes grupos receptores. Por ejemplo, un cepa del RSV con posiciones de genes desplazadas manipulado que expresa una citoquina o una proteína adicional rica en epítopos de células T puede ser particularmente ventajosa para adultos en lugar de para niños. Las vacunas del RSV producidas de acuerdo con la presente descripción pueden ser combinadas con virus que expresan antígenos de otro subgrupo o cepa del RSV para conseguir protección contra múltiples subgrupos o cepas del RSV. Alternativamente, los virus para vacunas pueden incorporar epítopos protectores de múltiples cepas o subgrupos del RSV manipulados en un clon del RSV como se ha descrito en la presente memoria.

Típicamente cuando se usan virus de vacunas diferentes se administrarán en una mezcla simultáneamente, pero también pueden ser administrados por separado. Por ejemplo, como las glicoproteínas F de los dos subgrupos del RSV difieren solo en aproximadamente 10% de la secuencia de aminoácidos, esta similitud es la base de una respuesta inmune protectora cruzada como se observa en animales inmunizados con RSV o antígeno F y enfrentados con una cepa heteróloga. Por tanto, la inmunización con una cepa puede proteger contra cepas diferentes del mismo o diferente subgrupo. Sin embargo, la protección óptima probablemente requerirá la inmunización contra ambos subgrupos.

Las vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas, descritas en la presente memoria, desencadenan la producción de una respuesta inmune que es protectora contra la enfermedad grave del tracto respiratorio inferior, tales como neumonía y bronquiolitis cuando el individuo es subsiguientemente infectado con RSV de tipo silvestre. Aunque el virus naturalmente circulante sea todavía capaz de causar infección, particularmente en el tracto respiratorio superior, existe una posibilidad grandemente reducida de rinitis como resultado de la vacunación y posible refuerzo de la resistencia por subsiguiente infección por virus de tipo silvestre. Después de la vacunación, existen niveles detectables de anticuerpos serológicos y secretores engendrados por el hospedante que son capaces de neutralizar los virus de tipo silvestre homólogos (del mismo subgrupo) *in vitro* e *in vivo*. En muchos casos los anticuerpos del hospedante también neutralizarán virus de tipo silvestre de un subgrupo diferente que no es de vacuna.

Los RSV con posiciones de genes desplazadas preferidos descritos en la presente memoria exhiben una disminución muy sustancial de la virulencia cuando se comparan con los virus de tipo silvestre que están circulando naturalmente en seres humanos. El virus con posiciones de genes desplazadas está suficientemente atenuado de modo que los síntomas de infección no ocurrirán en la mayoría de los individuos inmunizados. En algunos casos el virus atenuado todavía puede ser capaz de diseminación en individuos no vacunados. Sin embargo, su virulencia es suficientemente eliminada, de tal modo no ocurren graves infecciones de los tractos respiratorios inferiores de los hospedantes vacunados o incidentales.

El nivel de atenuación de los virus para vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas puede ser determinado, por ejemplo, cuantificando la cantidad de virus presentes en el tracto respiratorio de un hospedante inmunizado y comparando la cantidad con la producida por los RSV de tipo silvestre u otro RSV atenuado que hayan sido evaluados como cepas para vacunas candidatos. Por ejemplo, el virus químérico atenuado tendrá un mayor grado de restricción de la replicación en el tracto respiratorio superior de un hospedante altamente susceptible, tales como un chimpancé, comparado con los niveles de replicación del virus de tipo silvestre, por ejemplo, que es 10 a 1000 veces menos. También, el nivel de replicación de la cepa para vacuna del RSV atenuado en el tracto respiratorio superior del chimpancé debe ser menor que el de mutante A2 ts-1 del RSV, que se demostró previamente que estaba incompletamente atenuado en niños seronegativos humanos. Para reducir el desarrollo de rinorrea, que está asociada con la replicación de virus en el tracto respiratorio superior, un candidato ideal para vacuna debe exhibir un nivel restringido

de replicación en ambos tractos respiratorios superior e inferior. Sin embargo, el virus atenuado debe ser suficientemente infeccioso e inmunógeno en seres humanos para conferir protección a los individuos vacunados. Los métodos para determinar los niveles del virus RS en la nasofaringe de un hospedante infectado son muy conocidos en literatura científica. Las muestras se obtienen por aspiración o lavado de secreciones nasofaríngeas y los virus se cuantifican en 5 cultivo de tejidos u otro método de laboratorio. Véase, por ejemplo, Belshe *et al.*, *J. Med. Virology*, 1:157-162, 1977; Friedewald *et al.*, *J. Amer. Med. Assoc.*, 204:690-694, 1968; Gharpure *et al.*, *J. Virol.*, 3:414-421, 1969; y Wright *et al.*, *Arch. Ges. Virusforsch.*, 41:238-247, 1973. Los virus pueden medirse convenientemente en la nasofaringe de animales hospedantes, tales como chimpancés.

10 En algunos casos puede ser deseable combinar vacunas del RSV con posiciones de genes desplazadas como las descritas en la presente memoria con vacunas que inducen respuestas protectoras frente a otros agentes, particularmente otros virus de la niñez. Por ejemplo, una vacuna del RSV con posiciones de genes desplazadas como las descritas en la presente memoria puede ser administrada simultáneamente con una vacuna para el virus de la parainfluenza, tales como las descritas en Clements *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 29:1175-1182, 1991. En otro aspecto de esta descripción el 15 RSV químico puede ser empleado como un vector para antígenos protectores de otros patógenos del tracto respiratorio, tal como PIV, incorporando las secuencias que codifican antígenos protectores en el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas que se usa para producir RSV recombinantes infecciosos, como se describe en la presente memoria.

20 En incluso otro aspecto de la presente descripción se emplea un RSV con posiciones de genes desplazadas como vector para terapia transitoria de genes del tracto respiratorio. De acuerdo con este aspecto el genoma o antigenoma del RSV con posiciones de genes desplazadas incorpora una secuencia que es capaz de codificar un producto génico de interés. El producto génico de interés está bajo el control del mismo o diferente promotor del que controla la expresión 25 del RSV. El RSV infeccioso producido por co-expresión del genoma o antigenoma del RSV recombinante con las proteínas N, P, L y M2(ORF1) y que contienen una secuencia que codifica el producto génico de interés se administra a un paciente. Esto puede implicar un RSV recombinante que es completamente infeccioso (es decir, competente para infectar células cultivadas y producir una progenie infecciosa), o puede ser un RSV recombinante que, por ejemplo, carece de uno o más genes de las glicoproteínas de superficie G, F y SH y se propaga en células que proporcionan una o más de estas proteínas en trans por expresión estable o transitoria. En tal caso, el virus recombinante producido 30 sería competente para infección eficaz, pero sería altamente ineficaz en producir partículas infecciosas. La falta de glicoproteínas de superficie expresadas en células también reduciría la eficacia del sistema inmune hospedante en eliminar las células infectadas. Estas características aumentarían la durabilidad y seguridad de la expresión del gen extraño.

35 Con respecto a la terapia génica, la administración es típicamente por aerosol, nebulizador u otra aplicación típica al tracto respiratorio del paciente que se trata. El RSV con posiciones de genes desplazadas se administra en una cantidad suficiente para dar como resultado la expresión de niveles terapéuticos o profilácticos del producto génico deseado. Ejemplos de productos génicos representativos en los cuales se administran en este método incluyen los que codifican, por ejemplo, aquellos particularmente adecuados para expresión transitoria, por ejemplo, interleuquina-2, 40 interleuquina-4, gamma-interferón, GM-CSF, G-CSF, eritropoyetina, y otras citoquinas, glucocerebrosidasa, fenilalanina-hidroxilasa, regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), hipoxantina-guanina-fosforibosol-transferasa, citotoxinas, genes supresores de tumores, RNA(s) antisentido y antígenos de vacunas.

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

Ejemplo I

Los ejemplos que no se refieren específicamente a la invención reivindicada se incluyen solamente para ilustración.

50 *Construcción del RSV recombinante en el cual los genes G y F han sido transpuestos a una posición próxima al promotor solos o en combinación*

El presente ejemplo documenta la transposición del orden de genes del RSV infeccioso con la cual uno o más 55 gen(es) o segmento(s) de genoma que codifican un determinante antigénico, ilustrado por el (los) gen(es) G y/o F es/están desplazado(s) a una posición más próxima al promotor. En un ejemplo presentado más adelante, los genes G y F son movidos coordinadamente desde sus posiciones de orden de genes de tipo silvestre para ocupar las posiciones transpuestas 1 y 2 del genoma o antigenoma recombinante del RSV. Esta manipulación se realizó con un cDNA clonado de RNA antigenómico del RSV del cual estaba delecionado el gen SH (a veces abreviadamente en lo sucesivo RSV ΔSH), como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999).

60 El RSV de tipo silvestre del cual está delecionado el gen SH crece tan bien o ligeramente mejor que el RSV de tipo silvestre completo *in vitro*, y está ligeramente atenuado en el tracto respiratorio superior de ratones y en los tractos respiratorios superior e inferior de chimpancé (Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999). Sus niveles de inmunogenicidad y eficacia protectora son estrechamente comparables con los del virus de tipo silvestre. Por tanto, el RSV ΔSH está ligeramente atenuado comparado con el virus de tipo silvestre, pero por otra parte tiene propiedades biológicas muy similares, y representa el virus parental en estos 65 estudios. Estas características del virus RSV ΔSH, combinadas con la mayor estabilidad genética de los mutantes por delección del RSV en general, hace a este fondo particularmente útil como recombinante parental para la producción del RSV con posiciones de genes desplazadas, facilitando la recuperación y manipulación de derivados mutantes.

ES 2 317 914 T3

El cDNA antigenómico fue manipulado y el virus recombinante fue recuperado usando métodos y estrategias descritas anteriormente (véase también, Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-6641, 1996; Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 72:4467-4471, 1998; Whitehead *et al.*, *Virology*, 247:232-239, 1998; Birmingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999; Collins *et al.*, *Virology*, 259:251-255, 1999; Bukreyev *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2367-2372, 1999; Juhasz *et al.*, *Vaccine*, 17:1416-1424, 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 73:5176-5180, 1999; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-9780, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:871-877, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; patente de EE.UU. Nº 5.993.824). El cDNA antigenómico se manipuló en forma de tres subclones. Un subclon, D51/ΔSH, contiene el promotor de T7 y el extremo de lado izquierdo del genoma de la región delantera hasta el extremo aguas abajo del gen M. El segundo subclon, pUC19-GFM2, contiene los genes G, F y M2 de la parte central del genoma. El tercer subclon, D39, contiene el gen L seguido por la región trasera del extremo del lado derecho del genoma seguido por una secuencia de ribosoma autoescindible y terminadores de la transcripción de T7 en tandem.

Se usó PCR con cebadores mutágenos para amplificar y modificar los extremos de los cDNA que contenían los genes G y F separadamente o juntos como un solo cDNA de G-F (Figura 1). Para preparar un cDNA de G solo por inserción, se usó PCR para amplificar los nucleótidos 4692-5596 de la secuencia antigenómica del RSV recombinante completa (que se extiende desde el ATG que inicia el ORF de G hasta el extremo aguas debajo de la señal de fin del gen G). Los cebadores de PCR se diseñaron para añadir, inmediatamente después de la señal de fin del gen G, los primeros 6 nucleótidos de la región intergénica (IG) G-F seguidos por una copia de la señal de comienzo de gen (GS) de 10-nucleótidos del gen NS1 (Figura 1). Los cebadores de PCR también se diseñaron para añadir un sitio *Bsp*I en ambos extremos del cDNA amplificado. Para hacer un cDNA del gen F solo por inserción, se usó PCR para amplificar los nucleótidos 5662-7551 de la secuencia antigenómica completa (que se extiende desde ATG que inicia el de ORF de F hasta el extremo de la señal de fin del gen F). Los cebadores de PCR se diseñaron para añadir, inmediatamente después de la señal de fin del gen F, los primeros 6 nucleótidos de la IG de F-M2 seguidos por una copia de 10 nucleótidos de la señal de comienzo del gen NS1. Los cebadores de PCR también colocaron un sitio *Bsp*I sitio en ambos extremos del cDNA.

Para preparar a cDNA que contenga los genes G y F por inserción, se usó PCR para amplificar los nucleótidos 4692-7551 del cDNA antigenómico completo (que se extiende desde el ATG del ORF de G hasta el extremo de la señal de fin del gen F) (Figura 1). Los cebadores de PCR se diseñaron para añadir, inmediatamente después de la señal de fin del gen F, los primeros 6 nucleótidos de la IG de F-M2 seguidos por una copia de la señal de fin del gen NS1. Los cebadores de PCR también se diseñaron para añadir un sitio *Bsp*I en ambos extremos del cDNA. Todos los cDNA se secuenciaron en su totalidad para confirmar las estructuras.

Para construir un sitio próximo al promotor para inserción del cDNA de los genes G, F, o G-F, la región no codificadora situada aguas arriba del gen NS1 fue modificada por sustituciones de nucleótidos en las posiciones del antígenoma 92 (G a C, sentido positivo) y 97 (A a C), creando con ello un sitio *Bsp*I (Figura 1). Esta manipulación se realizó en un subclon *Bsp*I-MfeI que contenía los primeros 419 nucleótidos del RNA antigenómico del RSV. Las sustituciones de nucleótidos se introdujeron por PCR en el plásmido completo (Byrappa *et al.*, *Genome Research*, 5:404-407, 1995). El fragmento *Bsp*I-MfeI modificado fue reinsertado en D51/ΔSH, y este subclon sirvió a su vez como receptor para los fragmentos de cDNA de G, F, y G-F *Bsp*I construidos como se ha descrito anteriormente. Debido a que *Bsp*I tiene una secuencia de reconocimiento heptámera asimétrica, los fragmentos solamente pueden ser insertados en la orientación correcta.

Cuando el cDNA de G, F o G-F se colocó en posición próxima al promotor, el (los) gen(es) correspondiente(s) fue/fueron delecionados de la posición normal aguas abajo, de modo que cada genoma recombinante incorporó una sola copia de G y F (Figura 1). Para delecionar G solo, la PCR se realizó en pUC19-G-F-M2 para amplificar el fragmento *Sst*I-*Hpa*I (nucleótidos 5611-6419, que se extienden desde la IG de G-F en la parte central del gen F). Además esta PCR añadió la secuencia: TTAATTAAAAACATATTACACAAA (SEQ ID NO: 3) al extremo aguas arriba del cDNA. Esta secuencia contiene un sitio *Pac*I (en cursiva), que en el cDNA antigenómico está localizado dentro de la señal de fin del gen SH. Esta pieza podría ser introducida luego como un fragmento *Pac*I-*Hpa*I en la ventana *Pac*I-*Hpa*I de pUC19-GFM2 no modificado, delecionando con ello el gen G. La secuencia del fragmento de cDNA que había sido sometida a PCR se confirmó por secuenciación de didesoxinucleótidos.

Alternativamente, para delecionar F solamente, la PCR se realizó sobre pUC19-GFM2 para amplificar el fragmento que va desde el sitio *Pac*I sitio en el nucleótido 4618 hasta la señal de fin del gen G en el nucleótido 5596. Además esta PCR añadió la secuencia CACAATTGCATGC (SEQ ID NO: 4) en el extremo aguas abajo del cDNA. Esta secuencia contenía la parte aguas arriba de la secuencia IG de F-M2 seguida por un sitio *Sph*I (en cursiva) que está presente en la IG de F-M2 del antígenoma recombinante del RSV. La clonación de este cDNA como un fragmento *Pac*I-*Sph*I en la ventana *Pac*I-*Sph*I de pUC19-GFM2 no modificado dio como resultado la delección del gen F. La secuencia del fragmento de cDNA que había sido sometido a PCR se confirmó por secuenciación de didesoxinucleótidos.

Para delecionar ambos genes G y F, el fragmento *Sph*I-*Bam*HI, se usó PCR por el método de Byrappa (Byrappa *et al.*, *Genome Research*, 5:404-407 (1995)) para amplificar los nucleótidos 7559-8506 de pUC-GFM2 (que se extienden desde la IG de F-M2 hasta el solapamiento M2/L) con la siguiente secuencia añadida al extremo aguas arriba del cDNA: TTAATTAAAAACACAATT (SEQ ID NO: 5). La inserción de cDNA resultante contiene un sitio *Pac*I (en cursiva) y la parte aguas arriba de la secuencia IG de F-M2 que inmediatamente precede al sitio *Sph*I, pero carece de

los genes G y F. La secuencia del fragmento de cDNA que había sido sometida a PCR se confirmó por secuenciación de didesoxinucleótidos.

Los cDNA antigenómicos completos se ensamblaron luego como se ha descrito anteriormente (véase también, 5 Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-6641, 1996; Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71: 8973-8982, 1997; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 72:4467-4471, 1998; Whitehead *et al.*, *Virology* 247:232-239, 1998; Birmingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11259-11264, 1999; Collins *et al.*, *Virology* 259:251-255, 1999; Bukreyev *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2367-2372, 1999; Juhasz *et al.*, *Vaccine*, 17:1416-1424, 1999; Juhasz *et al.*, *J. Virol.*, 73:5176-5180, 1999; Teng y Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; 10 Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-9780, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:871-877, 1999; Whitehead *et al.*, *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; y Patente de EE.UU. Nº 5.993.824). Este ensamblaje proporcionó cDNA antigenómicos que los codifican cDNA de *BlpI*/ Δ SH, G1/ Δ SH, F1/ Δ SH, y G1F2/ Δ SH.

Estos cDNA fueron transfectados individualmente en células HEp-2 junto con plásmidos de soporte de N, P, M2-1 15 y L e incubados a 32°C (véanse, por ejemplo, Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995; Collins *et al.*, *Virology*, 259:251-255, 1999; Patente de EE.UU. Nº 5.993.824). Los líquidos sobrenadantes de la transfección se sometieron a pases por células recientes 3 días más tarde, y luego se sometieron a pases en serie en células HEp-2 a 37°C con intervalos de cosecha de 3 a 7 días. Los intervalos de tiempo más cortos fueron necesarios para las monocapas infectadas con los virus F1/ Δ SH y G1F2/ Δ SH porque exhibían un desarrollo más rápido de sincitios y subsiguiente 20 destrucción de células. Se interpretó que esto reflejaba la expresión aumentada de la proteína fusogénica F debido a la alteración de la posición del gen F. Partes alícuotas de cada líquido sobrenadante cosechado se congelaron bruscamente y se titularon más tarde en paralelo, como se muestra en la Figura 2. Estos resultados indican que la eficacia de recuperación y amplificación de los virus G1F2/ Δ SH y F1/ Δ SH superó a las de los virus *Blp*/ Δ SH o G1/ Δ SH, como 25 también se determinó con respecto al virus Δ SH y al virus de tipo silvestre.

Se aisló el RNA total de células infectadas con cada uno de los virus recombinantes, y se realizó la RT-PCR de segmentos apropiados de genoma que confirmó que se diseñaron y construyeron las estructuras genómicas manipuladas. Además el análisis por transferencia Northern confirmó la expresión de los mRNA sub-genómicos apropiados.

Los siguientes virus se compararon luego con relación a la cinética de crecimiento y producción de antígeno *in vitro*: el RSV de tipo silvestre (que contienen el gen SH), Δ SH (con el gen SH deleticado pero que no contiene un sitio *BlpI* sitio en la región no codificadora de NS1), *Blp*/ Δ SH, G1/ Δ SH, y G1F2/ Δ SH. Cultivos en monocapas por duplicado de células HEp-2 y células Vero se infectaron a un MOI de 0,1 unidades formadoras de placas (UFP) por célula con un periodo de adsorción de 1 hora (-1 a 0 horas). Las monocapas se lavaron luego tres veces y se incubaron 35 a 37°C. Dos monocapas por duplicado por virus se cosecharon a intervalos de 12 horas, comenzando inmediatamente después de la adsorción a t=0 horas. Los medios sobrenadantes se congelaron súbitamente para análisis posterior para valoración en placas para cuantificar los virus infecciosos (Figura 3A). Esto mostró que los virus eran comparables en su capacidad de producir virus infecciosos en células Vero (Figura 3A, panel superior) y en células HEp-2 (Figura 3A, panel inferior).

En el mismo experimento, se cosecharon monocapas de células Vero de cada momento de tiempo (Figura 3A, 40 panel superior) y se analizaron por transferencia Western para caracterizar la expresión de proteína G (Figura 4). Una muestra de las proteínas totales de las células infectadas de cada momento de tiempo se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizado, se transfirió a nitrocelulosa, y se analizó por incubación con un antisuero 45 específico para un péptido de la proteína G. Los anticuerpos unidos se detectaron y cuantificaron usando un kit de quimioluminiscencia comercial. El anticuerpo se unió a dos formas principales asociadas a las células de la proteína G, a saber la forma completamente madura mayor de 90 kDa y la forma incompletamente glicosilada menor de 50 kDa. Esta comparación mostró que, aunque la producción de partículas infecciosas fue similar para todos los virus 50 (Figura 3A, panel superior), la cantidad de proteína G asociada a las células era considerablemente mayor en las células infectadas con el virus G1/ Δ SH o G1F2/ Δ SH (Figura 4). La cuantificación de las bandas de gel por densitometría de la película expuesta indicó que los virus G1/ Δ SH y G1F2/ Δ SH expresaban 6 veces y 4 veces, respectivamente, más proteína G que el virus *Blp*/ Δ SH.

Monocapas de células infectadas con los virus F1/ Δ SH o G1 F2/ Δ SH exhibían un rápido comienzo del efecto citopático que implica la formación de sincitios, como se ha mencionado anteriormente. Esto se interpretó que reflejaba el aumento de la expresión de la proteína F. Este efecto citopático aumentado no contraindicaría el uso de este virus como una vacuna, puesto que la infección *in vivo* con un virus de vacuna implica solamente una pequeña cantidad de células epiteliales que mueren y son reemplazadas, tanto si el comienzo de la citopatogenicidad para estas células dispersadas es o no es más rápido. Sin embargo, podría haber ocurrido que títulos más altos de virus hubieran sido conseguidos si la citopatogenicidad *in vitro* hubiera sido menos rápida. La resolución de estos factores se conseguirá 60 por construcción del RSV con posiciones de genes desplazadas en fondos que están más altamente atenuados. Es notable en este contexto que los desplazamientos de genes no interferían con el crecimiento del RSV pero si aumentaban varias veces la expresión total de proteína G.

En otros estudios se comparó la capacidad de virus con desplazamiento de genes para replicarse en monocapas de células HEp-2 y Vero en un experimento en el cual la multiplicidad de infección fue 3,0 (Figura 3B). Esto se hizo en dos experimentos separados que proporcionaron resultados similares. Los datos para uno de los experimentos se muestran en la Figura 3B. En un ensayo de crecimiento de un solo ciclo, cada uno de los tres virus que contienen G y/o

ES 2 317 914 T3

F en la posición próxima al promotor, a saber: G1/ΔSH, F1/ΔSH, y G1F2/ΔSH, se replicaron más eficazmente que el virus Blp/SH de control. Además, la diferencia fue mayor en células Vero que en células HEp-2. Por ejemplo, 24 horas después de la infección, el título del virus G1/ΔSH fue $7,2 \times 10^6$ UFP/ml, comparado con $6,8 \times 10^6$ UFP/ml para el virus Blp/ASH de control en células HEp-2, una diferencia de $0,4 \log_{10}$ mientras que los valores respectivos en células

5 Vero fueron $6,6 \times 10^6$ UFP/ml para el virus G1/ΔSH virus y $5,6 \times 10^6$ UFP/ml para el virus Blp/ASH de control, una diferencia de $1,01 \log_{10}$. Cada uno de los otros virus con desplazamiento de genes tenía también títulos superiores a los del virus de control. Por tanto, el desplazamiento de los genes G y/o F a la posición próxima al promotor proporcionó, en este ejemplo, un aumento en el rendimiento de virus en ambas células HEp-2 y Vero, con un rendimiento máximo de 10 veces en células Vero, que es una línea celular que es útil para la producción de virus a gran escala.

10

Los virus recombinantes con desplazamientos de genes también se examinaron en cuanto a su capacidad para replicarse en el tracto respiratorio superior e inferior de ratones BALB/c (Tabla 1). Los ratones en grupos de 18 animales cada uno se infectaron con 10^6 UFP por animal de G1/ΔSH, F1/ΔSH, G1F2/ΔSH, o el virus Blp/ΔSH de control. En los días 3, 4 y 5 posteriores a la infección se sacrificaron seis animales de cada grupo, y se recogieron y analizaron los 15 turbinatos nasales (pequeños huesos esponjosos y cilíndricos de las fosas nasales) y los pulmones por valoración en placas para determinar los títulos de los virus en los tractos respiratorios superior e inferior, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 1, los niveles de replicación de los virus B1p/ΔSH y F1/ΔSH fueron esencialmente indistinguibles. Por tanto, aunque el segundo virus se replicó algo más eficazmente *in vitro*, su replicación *in vivo* no fue cambiada. La ausencia de replicación o virulencia aumentada simplificaría la modificación de los virus con desplazamiento de 20 genes por adición de mutaciones atenuadoras. La replicación del virus G1F2/ΔSH fue marginalmente inferior a las del virus Blp/ΔSH de control "de tipo silvestre", y la replicación del virus G1/ΔSH también fue inferior, particularmente en las fases tempranas de la infección. Por ejemplo, el día 3 el virus G1/ΔSH era $0,7 \log_{10}$ menor en ambos tractos respiratorios superior e inferior comparado con el virus Blp/ΔSH de control.

25

TABLA 1

Replicación, en el tracto respiratorio superior e inferior de ratones, del RSV recombinante que contiene los genes G y/o F en la posición próxima al promotor

30

Virus ¹	Día 3	Título medio en los turbinatos nasales ± ET (\log_{10} UFP/g de tejido Día 4)	Día 5	Día 3	Título medio en los pulmones ± ET (\log_{10} UFP/g de tejido) Día 4	Día 5
B1p/ΔSH	$4,20 \pm 17$	$4,0 \pm 0,32$	$3,5 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,26$	$4,1 \pm 0,37$	$4,5 \pm 0,09$
G1/ΔSH	$3,5 \pm 0,24$	$3,4 \pm 0,54$	$3,5 \pm 0,24$	$2,9 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,34$	$4,6 \pm 0,13$
F1/ΔSH	$4,4 \pm 0,11$	$4,1 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,12$	$3,9 \pm 0,09$	$4,7 \pm 0,08$	$4,9 \pm 0,16$
G1F2/ΔSH	$3,3 \pm 0,50$	$3,5 \pm 0,13$	$3,3 \pm 0,13$	$3,1 \pm 0,13$	$4,2 \pm 0,28$	$4,1 \pm 0,07$

1 Ratones BALB/C en grupos de 18 fueron inoculados intranasalmente con 10^6 UFP por ratón del virus indicado el día 0. En los días 3, 4 y 5, fueron sacrificados seis ratones y los turbinatos nasales y los pulmones se recogieron y se determinaron los títulos de virus por ensayo en placas. Se muestra los títulos medios con el error típico indicado (ET).

50

Por tanto, desplazar uno o más genes a la posición próxima al promotor o transponer genes del RSV en general, 55 puede atenuar modestamente al virus para la replicación *in vivo*. Esto tiene valor para diseñar una cepa atenuada para vacuna, puesto que se añade al menú de métodos de atenuación útiles. Además, es importante tener mutaciones atenuadoras que representan diferentes clases o tipos, tales como mutaciones puntuales sensibles a la temperatura, mutaciones puntuales no sensibles a temperatura, delecciones de genes, y así sucesivamente. Los diferentes tipos de mutación operan de diferentes modos para afectar al fenotipo viral, y la presencia de múltiples tipos de mutaciones en un solo virus para vacuna confiere mayor estabilidad. La atenuación por desplazamiento de genes representa una clase útil adicional de mutaciones atenuadoras en este contexto. El descubrimiento de que los desplazamientos de genes de acuerdo con la invención pueden conferir un modesto grado de atenuación proporciona nuevas herramientas útiles para el ajuste fino del fenotipo de atenuación de cepas para vacunas.

60

Ciertas mutaciones atenuadoras útiles para uso con la invención son de una variedad "condicional", en donde la atenuación es mínima en condiciones especificadas (por ejemplo, *in vitro*) y máxima en otras condiciones (por ejemplo, *in vivo*). Un fenotipo de atenuación que es mínimo o no operativo *in vitro* permite la producción eficaz de virus para vacunas, lo que es particularmente importante en el caso del RSV y otros virus que crecen malamente en cultivos de

ES 2 317 914 T3

células. Naturalmente, como se ilustra en la presente memoria, el fenotipo de atenuación debe ser operativo con el fin de reducir la enfermedad y reactogenicidad del virus para vacuna.

- El virus recombinante G1/ΔSH mostrado en la presente memoria ilustra una combinación particularmente deseable de rasgos resultantes del desplazamiento de genes. Específicamente, su crecimiento *in vitro* realmente fue aumentado hasta 10 veces, mientras su replicación *in vivo* fue disminuida moderadamente. Esto proporciona la ventaja de mejor eficacia de producción de vacunas junto con atenuación *in vivo*, y mejor expresión de antígenos, como se ha descrito anteriormente.
- La inmunogenicidad de los virus con desplazamiento de genes *in vivo* si investigó en ratones BALB/c. Los ratones en grupos de seis se infectaron con los virus individuales como se ha descrito inmediatamente anteriormente, y se tomaron muestras de suero 1 día antes de la inoculación y 28 y 56 días después de la inoculación (Tabla 2). Las muestras de suero se analizaron por ensayo con inmunoadsorbente unido a enzima (ELISA) específico de proteínas, específico para IgG (Tabla 2). El análisis de la IgG específica de la proteína G mostró que las respuestas a los virus F1/ΔSH y G1F2/ΔSH eran muy similares a las del virus B1p/ΔSH de control. Por otro lado, la respuesta específica de G al virus G1/ΔSH disminuyó moderadamente (hasta cuatro veces). Esto se debe probablemente al menos en parte a la replicación reducida de este virus, como se ha descrito anteriormente en la Tabla 1. El análisis de respuestas específicas de F mostró que los virus F1/ΔSH y G1F2/ΔSH tenían aumentos moderados (2,5 a 4 veces) en niveles de anticuerpos comparados con los virus G1/ΔSH y B1 p/ΔSH, lo cual es consistente con la interpretación de que mover el gen F a la posición próxima al promotor da como resultado una mayor expresión de antígeno *in vivo* y mayor inmunogenicidad. Además, estos resultados indicaron que el desplazamiento de genes puede originar una mayor inmunogenicidad *in vivo* en condiciones en donde la replicación global del virus inmunizante no está cambiada. Esto es un resultado altamente deseable, puesto que proporciona un método específico para preparar una vacuna del RSV que es inherentemente más inmunógena que el virus parental de tipo silvestre. Debe advertirse que el modelo de ratón puede usarse para identificar y caracterizar las propiedades biológicas de un virus y puede revelar nuevas características deseables, tales como las que se muestran en la presente descripción.

TABLA 2

Medida, por ensayo con inmunoadsorbente unido a enzima (ELISA) específico de proteínas, o respuestas de anticuerpos serológicos en ratones después de la infección con RSV recombinante que contiene el gen G y/o F en posición próxima al promotor

Título por ELISA de inmunoglobulina G de suero (\log_2 inverso de la media ± error típico) frente a la proteína del RSV indicada ² .								
	Virus ¹	Nº de animales por grupo	Pre	IgG anti G del RSV Día 28	Día 56	Pre	IgG anti F del RSV Día 28	
	B1p/ΔSH	6	$\leq 55,3 \pm 0$	$9,6 \pm 0,6$	$11,7 \pm 0,8$	$\leq 55,3 \pm 0$	$10,3 \leq 0,4$	
	G1ΔSH	6	$\leq 55,3 \pm 0$	$9,0 \pm 0,6$	$9,6 \pm 0,6$	$\leq 55,3 \pm 0$	$10,0 \leq 0,4$	
	F1ΔSH	6	$\leq 55,3 \pm 0$	$9,6 \pm 0,9$	$11,6 \pm 0,6$	$\leq 55,3 \pm 0$	$11,6 \leq 0,3$	
	G1F2ΔSH	6	$\leq 55,3 \pm 0$	$9,3 \pm 0,7$	$11,6 \pm 0,8$	$\leq 55,3 \pm 0$	$12,3 \leq 0,4$	
	1. Ratones BALB/C en grupos de seis fueron inoculados con 10^6 UFP de virus en 0,1 ml de inóculo el día 0.							
	2. Las muestras de suero se tomaron 1 día antes de la inoculación (Pre) y 28 y 56 días después de la inoculación, y se analizaron por ELISA específico de glicoproteínas para anticuerpos IgG contra las proteínas G ó F del RSV, como se indica. Los títulos medios se muestran con el error típico indicado							

Ejemplo II
RSV recombinante que incorpora los genes G y F en una posición desplazada próxima al promotor en un fondo altamente atenuado

Las mutaciones por desplazamiento de genes descritas anteriormente fueron introducidas en el contexto de un fondo genético en el cual estaba delecionado el gen SH. En virus de tipo silvestre, esta delección mejora modestamente

el crecimiento en cultivos de células, y es moderadamente atenuante *in vivo* (Bukreyev *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999). Sin embargo, un virus para vacuna del RSV que es seguro para administración a bebés y niños que nunca han estado expuestos a RSV requiere más atenuación que la que es proporcionada por la delección del gen Δ SH solo. Por lo tanto, el presente ejemplo es proporcionado para demostrar 5 que los mutantes por desplazamiento de genes de la invención pueden ser recuperados satisfactoriamente en un fondo altamente atenuado.

Se eligieron dos fondos para ilustrar este aspecto de la invención, uno que carece de ambos genes SH y NS2 y otro que carece de los genes SH, NS1 y NS2. Como se describió en las referencias anteriormente incorporadas, las 10 delecciones Δ NS2 y Δ NS1 son altamente atenuantes por sí mismas (véase, por ejemplo, Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999). *In vitro*, la producción de virus que contienen cualquier mutación es retrasada y reducida, aunque en las condiciones de producción de vacunas se consigue unos rendimientos del virus Δ NS2 comparable a los 15 del virus de tipo silvestre. En chimpancés, los virus Δ NS2 y Δ NS1 están cada uno altamente atenuados para replicación y la enfermedad y son altamente inmunógenos y protectores contra la infección por RSV. Cada mutación sola es un candidato excelente para ser incluido en un virus recombinante para vacuna, ya sea por si misma o en combinación 20 con otras mutaciones. Las mutaciones de los virus Δ NS2 y Δ NS1 juntas dan como resultado un virus que está incluso más altamente atenuado *in vitro* que en el virus Δ NS2. En el presente ejemplo, se construyeron más combinaciones de estas delecciones y se analizaron en cuanto a su capacidad para soportar más mutaciones de posiciones de genes desplazadas.

20 Se construyeron cDNA antigenómicos en los cuales los genes G y F estaban movidos a las posiciones 1 y 2 de un antigenoma del cual habían sido delecionados los genes NS2 y SH, denominado G1F2/ Δ NS2 Δ SH (Figura 5, panel A), o a otras posiciones 1 y 2 de un antigenoma en el cual estaban delecionados los genes NS1, NS2 y SH genes, 25 denominados G1F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH (Figura 5, panel B). Estos cDNA antigenómicos se usaron para recuperar virus recombinantes como se ha descrito en el Ejemplo I anteriormente. En ambos casos, el virus recombinante se recuperó y propagó fácilmente *in vitro*. Por tanto, el presente ejemplo demuestra que pueden ser fácilmente producidos y recuperados RSV con posiciones de genes desplazadas que contienen múltiples mutaciones atenuadoras con los genes G y F desplazados a las posiciones próximas al promotor. Este y otros RSV con posiciones de genes desplazadas serán 30 analizados en cuanto a los niveles de replicación y expresión de antígenos, así como crecimiento, inmunogenicidad y eficacia protectora *in vivo* para seleccionar candidatos para vacunas adecuados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

En los ejemplos anteriores, los cambios representativos se hicieron en el orden de los genes del RSV para mejorar sus propiedades como vacunas atenuadas vivas. En particular, los genes G y F estaban movidos solos y en tandem, a 35 una posición más próxima al promotor. Estas dos proteínas ocupan normalmente las posiciones 7 (G) y 8 (F) en el orden de genes del RSV (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L). Para aumentar la posibilidad de recuperación satisfactoria, las manipulaciones se realizaron en una versión del RSV en la cual había sido delecionado el gen SH. Los genes G y F estaban movidos individualmente a la posición 1, o estaban movidos conjuntamente a las posiciones 1 y 2, respectivamente. Sorprendentemente, fueron recuperados fácilmente RSV recombinantes en los cuales los genes G 40 o F estaban movidos a la posición 1, o en los cuales los genes G y F estaban movidos a las posiciones 1 y 2, respectivamente. Este resultado difería grandemente de los estudios previos con VSV, en donde el movimiento del gen de la glicoproteína de VSV solamente en dos posiciones fue muy perjudicial para el crecimiento del virus. La capacidad para recuperar estos virus alterados también fue sorprendente porque el RSV se replica ineficazmente y porque el RSV tiene un orden complejo de genes y el movimiento de genes de glicoproteínas implicaban un gran número de cambios 45 de posición. Realmente, los RSV transpuestos crecen al menos tan bien como lo hacen sus precursores inmediatos que tienen el orden de genes de tipo silvestre. Como se indicó anteriormente, esto es particularmente importante para el RSV, puesto que el virus de tipo silvestre crece ineficazmente en cultivo de células y una reducción adicional en la replicación *in vitro* probablemente haría que la preparación de la vacuna fuera no factible. Es notable que la totalidad 50 de los genes de las proteínas NS1-NS2-N-P-M pudiera ser desplazada una o dos posiciones respecto al promotor sin una disminución significativa en la aptitud para el crecimiento. Además el examen de la expresión de la glicoproteína G mostró que estaba aumentada hasta varias veces la de su virus parental. Esto indicó que un virus de vacuna que contenía los genes G y/o F en la primera posición expresa una cantidad molar superior de estos antígenos protectores comparado con otras proteínas virales, y por tanto representa un virus con propiedades de vacunas altamente deseables.

55 Además, la modificación en el orden de los genes también se consiguió con dos candidatos para vacunas altamente atenuados producidos en un trabajo previo, en el cual el gen NS2 estaba delecionado por sí mismo como se ha descrito previamente, o en el cual los genes NS1 y NS2 genes estaban delecionados conjuntamente. En estos dos candidatos para vacunas, los genes de las glicoproteínas G y F estaban movidos conjuntamente a las posiciones 1 y 2 respectivamente, y los genes de las glicoproteínas G, F y SH estaban delecionados desde sus posiciones originales aguas abajo. Por tanto, los virus recuperados G1F2 Δ NS2 Δ SH y G1 F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH tenían dos y tres genes delecionados respectivamente además del desplazamiento de los genes G y F. Para ilustrar la extensión de los cambios implicados, puede compararse el orden de los genes del RSV de tipo silvestre (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L) y el virus G1F2/ Δ NS2 Δ SH (G-F-NS1-N-P-M-M2-L) o el virus Δ NS1 Δ NS2 Δ SH (G-F-N-P-M-M2-L). Esto muestra que estaban cambiadas las posiciones de la mayoría o la totalidad de los genes respecto al promotor. Sin embargo, estos 60 derivados altamente atenuados retienen la capacidad para ser hechos crecer en cultivos de células, lo que indica su clara utilidad para el desarrollo de virus candidatos para vacunas.

Ejemplo III

Construcción de un BRSV/HRSV quimérico que contiene los genes G y F de HRSV en una posición desplazada próxima al promotor

5 El presente ejemplo describe la construcción de un virus químico rBRSV/HRSV infeccioso en el cual los genes G y F del HRSV están sustituidos en el fondo del RSV (rBRSV) bovino recombinante. El virus químero humano-bovino resultante contiene dos genes de HRSV, a saber: G y F, y ocho genes de BRSV, a saber: NS1, NS2, N, P, M, SH, M2 y L. La descripción con más detalle de la construcción del RSV humano-bovino que tiene los genes G y F 10 humanos sustituidos en sus posiciones correspondientes de tipo silvestre en un fondo del RSV bovino (denominado rBRSV/Δ2) es proporcionada en la solicitud de patente de EE.UU. Nº de serie 09/602.212, presentada por Buchholz *et al.*, el 23 de junio 2000, su correspondiente solicitud PCT publicada como WO 01/04335 el 18 de enero de 2001, y su solicitud prioritaria provisional Nº 60/143.132 presentada el 9 de julio de 1999.

15 Además de la construcción de glicoproteína sustituida básica de rBRSV/A2, los genes G y F de HRSV estaban desplazados en el presente ejemplo a una posición más próxima al promotor en la cadena principal del rBRSV con respecto a la posición del orden de genes de tipo silvestre de los genes F y G en el genoma de BRSV. Más específicamente, los genes F y G estaban movidos desde su localización usual respecto al promotor, a saber desde las 20 posiciones de genes 7 y 8, respectivamente, a las posiciones 1 y 2, respectivamente. Para conseguir este objetivo, se construyó rBRSV infeccioso completo en el cual se hicieron sustituciones de nucleótidos para crear sitios *NotI*, *Sall* y *XhoI* únicos en las posiciones 67, 4.673 y 7.471, respectivamente (Figura 6, panel A) (véase también, Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000). El sitio *NotI* está contenido dentro de la región no traducida aguas arriba del gen NS1 de BRSV, y los sitios *Sall* y *XhoI* están en las regiones intergénicas. La digestión del cDNA antigenómico del rBRSV con *Sall* y *XhoI* escindió los genes G y F de BRSV en su totalidad y 25 creó extremos cohesivos (o adherentes) compatibles que fueron ligados (Figura 6, panel B). Esto dio como resultado un cDNA antigenómico de rBRSV que carece de los genes G y F y que contienen una región intergénica SH-M2 de 64 nucleótidos con la secuencia siguiente:

30 TAAACTTAAAAATGGTTATGtcgaGGAATAAAATCGAITAACAAACCAATCA
TTCAAAAAGAT

(SEQ ID NO: 6)

35 (los extremos cohesivos tetranucleotídicos de los sitios *Sall* y *XhoI* escindidos originales sitios están en letras minúsculas). Para comparación, la secuencia intergénica F-M2 de BRSV que existe naturalmente tiene una longitud de 55 nucleótidos.

40 Un cDNA que contiene los genes G y F de HRSV se preparó por PCR con cebadores mutágenos usados para modificar los extremos del cDNA. Específicamente, se usó PCR para amplificar los nucleótidos 4692-7551 del cDNA antigenómico del HRSV completo (que se extiende desde el ATG del ORF de G hasta el extremo de la señal de fin 45 del gen F), y los cebadores se diseñaron para añadir inmediatamente después de la señal de fin del gen F, los primeros 6 nucleótidos de la IG F-M2 seguido por una copia de la señal de comienzo del gen NS. Los cebadores de PCR también se diseñaron para añadir un sitio *BpAl* y un sitio *NotI* cada uno en ambos extremos del cDNA. La secuencia del fragmento de cDNA que se sometió a PCR se confirmó por secuenciación de dideoxínucleótidos. Este cDNA se insertó luego como un fragmento *NotI* en el sitio *NotI* único del cDNA antigenómico del rBRSV que carece de los genes G y F como se ha descrito anteriormente. Se identificó un recombinante correcto por cartografía de fragmentos de restricción, y se denominó rBRSV/A2-G1F2. La estructura del RNA genómico codificado se muestra en la Figura 6, panel C. Como se muestra en este cDNA los genes G y F estaban movidos desde las posiciones 7 y 8, respecto al promotor, a las posiciones 1 y 2.

50 Un plásmido que codifica el RNA antigenómico de rBRSV/A2-G1F2 se transfirió, junto con plásmidos que codifican las proteínas de soporte N, P, M2-1 y L, en células BSR T7/5, que expresan establemente la RNA polimerasa de T7, como se ha descrito anteriormente (véase también, Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000), y se recuperaron virus infecciosos. El virus rBRSV/A2-G1F2 recuperado se comparó con los rBRSV, rHRSV (también denominado rA2) y rBRSV/A2 con respecto a la eficacia de crecimiento en múltiples 55 ciclos en células HEp-2 humanas y células MDBK de bovino. Como se ha descrito anteriormente (véase también, Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000), el rHRSV crece mucho más eficazmente que el rBRSV en células HEp-2, y el virus rBRSV/A2 crece con una eficacia intermedia entre la de cada parental. Como se muestra en la Figura 7, la eficacia de replicación de rBRSV/A2-G1F2 era indistinguible de la de rBRSV/A2. Por tanto, inesperadamente, el cambio en la localización de los genes G y F no redujo la eficacia de crecimiento *in vitro*, permitiendo el nuevo 60 resultado la producción eficaz de virus para vacuna del RSV.

65 La inmunofluorescencia se realizó en células HEp-2 infectadas con HRSV wt o los virus químicos rBRSV/A2 o rBRSV/A2-G1F2. Esto se realizó usando dos anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas G o F de HRSV, a saber 021/01G y 44F, respectivamente (López *et al.*, *J. Virol.*, 72:6922-6928, 1998; Melero *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 78:2411-2418, 1997). La tinción se hizo con cada anticuerpo monoclonal individualmente. Aunque este ensayo es solamente semicuantitativo, se ha determinado previamente que el ensayo distingue fiablemente entre rBRSV wt y rBRSV/A2 (llevando este último los genes G y F de HRSV en la localización del genoma normal en la cadena principal de BRSV). En particular, el HRSV wt da un modelo extensivo muy fuerte de inmunofluorescencia indicativo

de una expresión de antígeno eficaz y extensiva, mientras que rBRSV/A2 da un modelo menos extensivo, más difuso y más débil (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000). Un ensayo comparable realizado para rBRSV/A2-G1 F2 (Figura 8), muestra que el modelo de inmunofluorescencia para este virus químérico desplazado hacia el promotor era muy similar al de HRSV wt. Este resultado es consistente con la mayor expresión de las glicoproteínas G y F. Al mismo tiempo, el efecto citopático asociado con rBRSV/A2-G1F2 se redujo comparado con el HRSV wt, y se parecía más estrechamente que el de rBRSV/A2 (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000). Específicamente, rBRSV/A2 y rBRSV/A2-G1F2 indujeron fiebre y sincitios más pequeños.

Por tanto, el presente ejemplo documenta la modificación del virus RS químérico humano-bovino rBRSV/A2, que contiene los genes para los principales antígenos protectores de HRSV, las proteínas G y F, en el fondo de BRSV que está fuertemente atenuado para replicación en el tracto respiratorio de primates. El virus rBRSV/A2 tiene una fuerte gama de restricción de hospedantes que lo hace altamente atenuado en primates. Puesto que el presente virus rBRSV/A2-G1F2 con posiciones de genes desplazada lleva la misma dotación de genes de BRSV en su fondo genético, es probable que comparta este fuerte fenotipo de restricción de la gama de hospedante, aumentando con ello la expresión de los dos principales antígenos protectores. La mayor expresión de estos dos antígenos protectores *in vivo* se espera más que aumente la inmunogenicidad de este virus. Por tanto, el presente ejemplo modificó y mejoró el virus rBRSV/A2 moviendo los genes de HRSV a una posición próxima al promotor. Un desplazamiento posicional de esta magnitud, es decir, donde los genes G y F estaban movidos desde las posiciones 7 y 8 de tipo silvestre respecto al promotor a las nuevas posiciones 1 y 2, no ha sido descrito previamente.

20 Ejemplo IV

Construcción de un BRSV/HRSV químérico con las proteínas M, G y F asociadas a la envolvente derivado de HRSV

El presente ejemplo demuestra todavía otro RSV con posiciones de genes desplazadas generado dentro de un fondo químérico humano-bovino que implica la modificación de un virus químérico antigeníco que se asemeja al virus químera rBRSV/A2 (que tiene los genes de los antígenos protectores G y F de HRSV en un fondo atenuado en la gama de hospedantes de BRSV), descrito anteriormente. Ambos BRSV y HRSV tienen 4 proteínas asociadas a la envolvente: las glicoproteínas G y F que son los principales antígenos protectores; la pequeña proteína hidrófoba SH de función desconocida que no parece ser un antígeno de neutralización o protector para HRSV (Whitehead *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; Connors *et al.*, *J. Virol.*, 65:1634-1637, 1991); y la proteína M de la matriz interna no glicosilada, que no es un antígeno protector, sino que es importante en el ensamblaje de viriones (Teng y Collins, *J. Virol.*, 72:5707-16, 1998).

En este ejemplo se construyó un virus químérico BRSV /HRSV en el cual estaban delecionados todos los cuatro genes de las proteínas asociadas a la envolvente de BRSV, a saber M, SH, G y F de BRSV, y en el cual estaban insertados en su lugar los genes de las proteínas asociadas a la envolvente de HRSV, a saber M, G y F. Esto proporciona un desplazamiento de genes próximo al promotor de los genes de las glicoproteína F y G en una distancia de un gen, correspondiente a la longitud del gen SH.

La construcción rBRSV/A2 anteriormente descrita (véase también, Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000) fue modificada para contener un sitio *MluI* único en la posición 3204, dentro de la región intergénica entre los genes P y M (Figura 9, panel A; IG P-M). Esto implicó la introducción de 5 sustituciones de nucleótidos. Los números de posición de los nucleótidos en la secuencia son con relación al antigenoma de rBRSV completo (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000; número de acceso a GenBank AF092942 o antigenoma de rHRSV completo en Collins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-11567, 1995), y los números de posición en la secuencia se refieren al HRSV están subrayados. El fragmento *MluI-SalI* se escindió y reemplazó por el fragmento *MluI-SalI* que lleva el gen M.

Haciendo referencia a la Figura 9, panel B, un cDNA que contiene el gen M de HRSV se amplificó y modificó por PCR usando cebadores que introdujeron cambios en los extremos de los cDNA. Específicamente, el cDNA de M fue modificado de modo que su extremo aguas arriba contenía un sitio *MluI*, seguido por el último nucleótido de la región intergénica P-M (que es la misma en HRSV y BRSV), seguido por el gen M de HRSV completo, seguido por los 4 primeros nucleótidos de la región intergénica SH-G de BRSV, seguido por un sitio *SalI*. La secuencia de este cDNA se confirmó que era correcta en su totalidad. Fue digerido con *MluI* y *SalI* y clonado en la ventana *MluI-SalI* del antigenoma de rBRSV. Esto dio como resultado rBRSV/A2-MGF. Como se muestra en la Figura 9, panel C, esta químera contenía una cadena principal de seis genes de BRSV, a saber: NS1, N52, N, P, M2 y L, y tres genes de proteínas de HRSV asociadas a su envolvente, a saber los genes M, G y F.

Este plásmido antigenómico se transfeció, junto con plásmidos que codifican las proteínas de soporte N, P, M2-1 y L, en células BSR T7/5, que establemente expresan la RNA polimerasa de T7, como se ha descrito con detalle previamente (Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-259, 1999; Buchholz *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000), y se recuperó virus infecciosos. Por tanto, el presente ejemplo también demuestra que pueden producirse y recuperarse fácilmente RSV con posiciones de genes desplazadas que contienen una delección de genes dando como resultado un desplazamiento próximo al promotor de los genes G y F. Estos y otros RSV con posiciones de genes desplazadas se analizarán en cuanto a niveles de replicación y expresión de antígenos, así como crecimiento, inmunogenicidad y eficacia protectora *in vivo* para seleccionar candidatos para vacunas adecuados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

Ejemplo V

Construcción y recuperación de virus químéricos BRSV/HRSV adicionales que contienen genes de proteínas de HRSV no estructurales y/o asociadas a la envolvente sustituidos en la cadena principal de BRSV

5 Se construyeron virus químéricos BRSV/HRSV adicionales que contenían los genes no estructurales NS1 y NS2 de HRSV y/o los genes M, SH, G y/o F asociados a la envolvente sustituidos en la cadena principal de BRSV. La mayoría de estos virus químéricos contenían los genes G y F derivados de HRSV, una característica deseable puesto que estos genes codifican los principales antígenos protectores y serían importantes para vacunas de HRSV eficaces.

10 En ciertos virus ilustrativos, los genes NS1 y NS2 de BRSV fueron reemplazados por sus respectivos equivalentes de HRSV. Las proteínas NS1 y NS2 han demostrado recientemente ser antagonistas del estado antiviral mediado por el interferón de tipo I (Schlender, *et al.*, *J. Virol.*, 74:8234-42, 2000) y la sustitución de estos genes ofrece un modo de modificar las propiedades de crecimiento y la virulencia de un virus de vacuna. Esto se debe al hallazgo general 15 de que los antagonistas del interferón tienden a ser específicos del hospedante (Young, *et al.*, *Virology*, 269:383-90, 2000; Didcock, *et al.*, *J. Virol.*, 73:3125-33, 1999; Didcock, *et al.*, *J. Virol.*, 73:9928-33, 1999). Por tanto, la inclusión de genes NS1 y NS2 específicos de BRSV en un virus de vacuna mejoraría su crecimiento en células de bovino pero constituiría una mutación atenuadora con respecto al crecimiento en células de primates y en los seres humanos vacunados.

20 Inversamente, los genes NS1 y NS2 específicos de HRSV ofrecerían un modo de mejorar el crecimiento de un virus de vacuna en células humanas. Por tanto, esto proporciona un nuevo método para manipular las propiedades de crecimiento y la reactogenicidad de un virus de vacuna. En otro virus, la dotación completa de genes de proteínas asociadas a la membrana específicos de HRSV, a saber: M, SH, G y F, se colocó en la cadena principal de BRSV. Puesto 25 que se cree que las diversas proteínas de partícula del virus interaccionan de diversos modos durante de expresión de los genes, la replicación del genoma, y la producción de viriones, la posibilidad de obtener una variedad de combinaciones proporciona una fuente rica de candidatos de vacunas.

30 Finalmente, este panel ilustrativo adicional de virus contenía ejemplos de genes que estaban sustituidos sin un cambio en el orden de los genes, otros en los cuales el orden de los genes de los virus sustituidos estaba alterado, así como otros en los cuales algunos de los genes sustituidos genes no tenían un cambio de orden con respecto a la cadena principal de BRSV mientras que otros si lo tenían. Por tanto, este panel proporcionó un ensayo riguroso de la capacidad para manipular virus derivados de cDNA para obtener una amplia disposición de virus químéricos, y recuperar virus viables con propiedades biológicas alteradas y deseables.

35 Se construyó un virus químérico BRSV/HRSV en el cual se eliminaron los genes NS1 y NS2 de la cadena principal de rBRSV y se reemplazaron con los genes NS1 y NS2 de HRSV, creando un virus denominado rBRSV/A2-NS1+2 (Figura 10, segunda construcción desde la parte superior). La cadena principal de esta construcción fue el cDNA antigenómico de rBRSV que había sido modificado para contener los sitios *NotI*, *KpnI*, *Sall* y *XhoI* únicos ilustrados 40 en la Figura 10 (construcción de la parte superior) y descritos con detalle previamente (Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-9, 1999; Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000). Las secuencias codificadoras de NS1 y NS2 de HRSV se amplificaron por PCR como un solo fragmento que abarcaba las posiciones 75 a 1036 de la secuencia antigenómica de HRSV completa e incluía el ORF de NS1 de HRSV, el empalme o unión de los genes NS1/N2, y el 45 ORF de NS2. El extremo aguas arriba del fragmento también contenía un sitio *NotI* añadido inmediatamente antes de la secuencia de HRSV y un sitio *BspI* añadido en la secuencia no traducida situada aguas arriba del ORF de NS1 en la posición 91 de HRSV. El extremo aguas abajo del cDNA obtenido por PCR contenía un sitio *KpnI* inmediatamente después de la secuencia de HRSV. Este producto de PCR se clonó y su secuencia se confirmó. Luego se insertó como un fragmento *NotI-KpnI* en la ventana correspondiente de la cadena principal del rBRSV.

50 Se preparó otro virus químérico BRSV/HRSV en el cual los siguientes cuatro genes de rBRSV fueron reemplazados con sus equivalentes de HRSV: NS1, NS2, G y F. Este virus se denomina rBRSV/A2-NS1+2GF (Figura 10, tercera construcción desde la parte superior). Esta construcción se hizo combinando los fragmentos de rBRSV/A2-NS1+2 y rBRSV/A2 previamente descrito (véase, las Figuras 7 y 8; la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 09/602.212; Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000), que opcionalmente es denominado en la presente memoria rBRSV/A2-GF. Específicamente ambas construcciones contenían un sitio *XmaI* en la secuencia del plásmido aguas arriba de la región delantera y el sitio *KpnI* ilustrado en la Figura 10. El fragmento *XmaI-KpnI* de rBRSV/A2-NS1+2 se transfirió a la ventana correspondiente del plásmido rBRSV/A2-GF.

60 Se preparó otro virus químérico BRSV/HRSV en el cual los siguientes cuatro genes de rBRSV fueron reemplazados por sus equivalentes de HRSV: M, SH, G y F. Este virus se denominó rBRSV/A2-MSHGF (Figura 10, cuarta construcción desde la parte superior). Esto implicó una cadena principal de rBRSV en la cual fue añadido además un sitio *MluI* a la región intergénica P-M (véase la Figura 9). Por tanto, la secuencia de HRSV insertada tenía como sus límites aguas arriba y aguas abajo los sitios *MluI* y *XhoI* mostrados en la Figura 9. Esta inserción en HRSV, que lleva la secuencia M-SH-G-F de HRSV flanqueada por los sitios *MluI* y *XhoI*, se preparó por PCR, y el producto resultante 65 se clonó y se confirmó su secuencia. El fragmento *MluI-XhoI* fue clonado luego en la ventana correspondiente en la cadena principal del rBRSV.

Se preparó otro virus químérico BRSV/HRSV en el cual los genes G y F estaban reemplazados por sus correspondientes de HRSV colocados en la tercera y cuarta posiciones en la cadena principal del rBRSV. Este virus se denominó rBRSV/A2-G3F4 (Figura 10, quinta construcción desde la parte superior). Para esta construcción, se usó PCR para amplificar los ORF de G y F del HRSV. Los cebadores de PCR se diseñaron para añadir al extremo aguas arriba de G

- 5 los siguientes elementos característicos: un sitio Kpn I, una señal de fin de gen de BRSV (5'-AGTTATTTAAAAA) y una secuencia intergénica de tres nts (CAT), que fue luego seguida por los genes G y F del HRSV. El extremo aguas abajo del fragmento amplificado terminó en la región no traducida aguas abajo del gen F del HRSV, en la posición antigenómica de HRSV 7420, seguida por un sitio Kpn I añadido. Este producto de PCR se clonó y se confirmó su secuencia. El fragmento Kpn I que lleva la secuencia de G y F del HRSV se clonó luego en el sitio Kpn I del cDNA del rBRSV que carece de los genes G y F como se muestra en la Figura 6, panel B. Un recombinante que contienen la inserción en la orientación correcta fue identificado por análisis de restricción.

10 Se preparó otro virus químérico BRSV/HRSV en el cual los siguientes genes estaban reemplazados en la cadena principal del rBRSV: NS1, NS2, G y F, con los genes G y F en la posición próxima al promotor. Esta construcción se 15 denomina HEx, o rBRSV/A2-G1F2NS3NS4 (Figura 10, construcción del fondo). Esta quimera se generó modificando rBRSV/A2-NS1+2 para reemplazar los genes G y F de BRSV por sus correspondientes de HRSV en la primera y segunda posición, del mismo modo que se ha descrito anteriormente para la construcción de rBRSV/A2-G1 F2 (Ejemplo III, Figura 6, panel B). Específicamente, los genes G y F del BRSV se escindieron del cDNA antigenómico del rBRSV/A2-NS1+2 por digestión con *Sall* y *XhoI*, como se ha descrito anteriormente (Ejemplo III). Subsiguientemente, un fragmento *NotI* que contiene los genes G y F de HRSV como el descrito anteriormente (Ejemplo III, Figura 20 6, panel B) se clonó en el sitio *NotI* singular que está localizado inmediatamente antes de la secuencia de HRSV en la región no codificadora NS1 del cDNA antigenómico de rBRSV/A2-NS1+2. Un recombinante que contienen la inserción en la orientación correcta fue identificado por análisis de restricción.

- 25 Cada uno de los virus enumerados anteriormente fue recuperado fácilmente a partir de cDNA, y en ningún caso hasta la fecha hubo un virus diseñado que no pudiera ser recuperado.

30 Los nuevos virus rBRSV/A2-G3F4 y HEx se compararon en cuanto a eficacia de crecimiento *in vitro* en paralelo con los virus rBRSV/A2-GF y rBRSV/A2-GF previamente analizados (como se indicó anteriormente, el último virus 35 fue denominado rBRSV/A2 en los ejemplos previos, pero fue renombrado aquí para ser comparado claramente con las nuevas construcciones). Cultivos en monocapas de células Vero fueron infectados a una multiplicidad de infección de 0,1 e incubados a 37°C. Se tomaron partes alícuotas en los momentos de tiempo mostrados en la Figura 11, y se determinó el título del virus por ensayos en placas. En estas condiciones, el BRSV se replica algo menos eficazmente que HRSV, reflejando su restricción de la gama de hospedantes en células de primates. Como se muestra en la Figura 40 11, panel de la parte superior, el rBRSV/A2-G3F4 exhibió un crecimiento mejorado *in vitro* comparado con los otros virus químéricos y el rBRSV. Realmente, su eficacia de crecimiento fue similar a la de HRSV recombinante (rA2). Por tanto, el crecimiento del virus rBRSV fue mejorado reemplazando los genes G y F del BRSV con sus correspondientes de HRSV (como en rBRSV/A2-GF), y fue aún más mejorado colocando los genes de HRSV en la posición próxima al promotor (como en rBRSV/A2-G1F2), y fue todavía más mejorado colocando los genes G y F del HRSV en las 45 posiciones 3 y 4 (como en rBRSV/A2-G3F4). Estos resultados demuestran como las propiedades de los virus como los descritos en la presente memoria pueden ser ajustadas sistemáticamente manipulando el origen y el orden de los genes virales.

50 El virus HEx se evaluó del mismo modo (Figura 11, panel del fondo). Su crecimiento fue intermedio al de rBRSV y rA2, indicando que este reemplazo de cuatro genes retenía la aptitud para la replicación *in vitro* y realmente excedió la de su parental rBRSV. Debe advertirse que las células Vero carecen de genes estructurales para interferones tipo I, y por tanto no pueden ser evaluados los efectos específicos del interferón. Por otro lado, las células Vero son un sustrato útil para la producción de vacunas a gran escala, y el crecimiento eficaz en estas células es una característica importante para un virus de vacuna.

55 El panel de virus químéricos rBRSV/HRSV fue evaluado adicionalmente para crecimiento sobre la base del tamaño de placas en células HEp-2 y MDBK, la primera de origen humano y la segunda de origen bovino (Figura 12, paneles de la parte superior y del fondo, respectivamente). Esta comparación también incluyó los virus químéricos descritos en los ejemplos previos, concretamente rBRSV/A2-GF (denominado previamente rBRSV/A2), rBRSV/A2-MGF, y rBRSV-G1 F2. En células HEp-2, el rHRSV produjo placas más grandes que lo hacía el rBRSV, consistente con la restricción de la gama de hospedante (Figura 12, panel de la parte superior). Este análisis considera principalmente aquellos virus en los cuales permanecían los genes NS1 y NS2 de origen BRSV. En este grupo, los virus rBRSV/A2-G3F4, rBRSV/A2-G1F2 y rBRSV/A2-GF produjeron placas que tenían un tamaño intermedio entre los de HRSV y BRSV y que disminuían en el orden dado. Esto es completamente consistente con los datos de la cinética de crecimiento, y confirma la idea de que la introducción de los genes G y F de HRSV en la cadena principal de rBRSV mejora su crecimiento en células HEp-2 células, y que puede obtenerse más mejora modificando las posiciones de estos genes. Los virus rBRSV/A2-MGF y rBRSV/A2-MSHGF produjeron placas que eran más pequeñas que las de rBRSV. Aunque este ejemplo muestra que estos virus pueden ser recuperados y manipulados, se necesitará más caracterización *in vitro* e *in vivo* para determinar la caracterización completa de sus propiedades de crecimiento.

60 65 El crecimiento en células HEp-2 también se examinó para aquellos virus en los cuales los genes NS1 y NS2 fueron de origen HRSV. Específicamente, se compararon pares de virus que eran idénticos excepto por el origen de los genes NS1 y NS2. Estos pares se listan a continuación, ordenados de tal modo que el virus que tiene genes NS1 y

ES 2 317 914 T3

NS2 de HRSV está en cada par: rBRSV frente a rBRSV/A2-NS1+2; rBRSV/A2-GF frente a rBRSV/A2-NS1+2GF; rBRSV/A2-G1 F2 frente a HE. En cada caso, la presencia de los genes NS1 y NS2 de origen HRSV proporcionó un aumento en el tamaño de placas, lo que indica una modulación de la restricción de la gama de hospedantes. Esto ilustra cómo puede ser seleccionado el origen de los genes NS1 y NS2 como un método de modular predeciblemente las propiedades de crecimiento de una vacuna de HRSV. En este ejemplo, los dos genes fueron manipulados como un par, aunque es evidente que también pueden ser manipulados solos de acuerdo con las enseñanzas mostradas en este texto.

Las características de estos virus en células MDBK de bovino también se muestran en la Figura 12, panel del fondo. La gama de restricción de hospedantes en estas células está invertida en comparación con la comparación precedente en células HEp-2, de tal modo que el BRSV produjo placas más grandes de HRSV. La presencia de los genes G y F de HRSV en la cadena principal de rBRSV no tenía mucho efecto en el crecimiento, mientras que la presencia de los genes NS1 y NS2 de origen HRSV atenuó el virus, presumiblemente porque estos antagonistas de interferón derivados de HRSV funcionaron menos eficazmente en células de bovino. Puesto que las células de bovino y los hospedantes bovinos no son una diana importante para estos candidatos de vacunas de HRSV, estos hallazgos con células MDBK sirven principalmente para proporcionar una comprensión más clara de las funciones de estas proteínas y su contribución al crecimiento.

En resumen, el ejemplo anterior ilustra cómo puede ser generado fácilmente un panel de candidatos para vacunas de HRSV recombinantes que exhiben un espectro de propiedades de crecimiento deseado. La evaluación clínica de los candidatos seleccionados proporcionará puntos de referencia para guiar la optimización de candidatos para vacunas por los métodos de esta invención. Los estudios previos indicaron que el rBRSV y su derivado rBRSV/A2-GF estaban sobre-atenuados en chimpancé, aun que este último virus fue una mejora sobre el rBRSV (Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000). Por tanto, las mejoras adicionales graduadas en el crecimiento que se obtuvieron en la presente invención representan avance sustancial hacia la optimización de recombinantes para vacunas del RSV.

Ejemplo VI

Construcción y recuperación virus químéricos BRSV/HRSV adicionales que contienen sustituciones de los genes N y/o P en cadenas principales de BRSV con proteínas NS1 y NS2 de origen HRSV o BRSV

El virus de la parainfluenza humano de tipo 3 (HPIV3) tiene un correspondiente bovino (BPIV3) que exhibe una restricción de la gama de hospedantes en primates y por tanto proporciona la base para desarrollar vacunas de HPIV3 atenuadas basadas en virus químéricos HPIV3/BPIV3. Una quimera prometedora consiste en la cadena principal de HPIV3 en la cual el ORF del gen N estaba reemplazado por su correspondiente de BPIV3. Notablemente, este virus químérico se replica eficazmente en cultivo de células y exhibe un fenotipo de atenuación en primates (Bailly, *et al.*, *J. Virol.*, 74:3188-95, 2000).

Dentro del presente ejemplo, se emprendieron investigaciones para determinar si los genes de BRSV individuales podían ser reemplazados por sus correspondientes de HRSV. Específicamente, el gen N y el gen P fueron sustituidos individualmente (Figura 13A). Se emprendieron estudios adicionales para determinar si los dos genes podían ser reemplazados conjuntamente. Finalmente, se realizaron investigaciones adicionales para determinar si los reemplazos de genes también podían ser hechos en una cadena principal que contiene los genes NS1 y NS2 de HRSV (Figura 13B). Debe advertirse que estas sustituciones se hicieron en la cadena principal de rBRSV, que lleva los genes G y F de BRSV. Para preparar una vacuna de HRSV óptima, estos genes serían reemplazados por sus correspondientes de HRSV, insertados en el orden natural de posiciones de genes o en otras posiciones, siguiendo las enseñanzas expuestas anteriormente en esta memoria, que demuestran que tales sustituciones pueden hacerse fácilmente, y de hecho proporcionan generalmente propiedades de crecimiento mejoradas.

Se construyó una quimera BRSV/HRSV en la cual la secuencia que codifica N de BRSV estaba reemplazada por la de HRSV. Esta quimera se denomina rBRSV/A2-N (Figura 13A). Para esta construcción, se insertó un sitio Aat II en el gen N de rBRSV en los nts 2305-2310, que está situado dentro de los tres últimos codones del ORF del gen N. La sustitución fue silenciosa a nivel de aminoácidos. El mismo sitio fue insertado en el ORF del gen N de HRSV del cDNA antigenómico del HRSV. Además el cDNA antigenómico del HRSV fue modificado de modo que los nts 1037-1042 antigenómicos de la región no traducida aguas abajo de NS2 fueran cambiados a un sitio Kpn I. Este fragmento de HRSV Kpn I-Aat II se clonó en la ventana correspondiente de rBRSV, transfiriendo la mayoría del ORF del gen N. Los muy pocos últimos codones del ORF del gen N de BRSV y HRSV tienen las mismas asignaciones de codificación de aminoácidos, y por tanto los pocos nts del ORF del gen N de BRSV que permanecen contribuyen a codificar una proteína N de HRSV completa.

Se construyó una quimera BRSV/HRSV en la cual el gen P del BRSV estaba reemplazado por su correspondiente de HRSV. Esta quimera se denomina rBRSV/A2-P (Figura 13A). Esto empleó el sitio Aat II anteriormente mencionado, así como el sitio Mlu I previamente descrito (véase la Figura 9). La transferencia de este fragmento de HRSV a la ventana correspondiente de rBRSV transfirió el gen P completo. Como se indicó anteriormente, los pocos nts del ORF del gen N que fueron transferidos en este fragmento tiene la misma asignación de codificación en BRSV y HRSV.

Se construyó la quimera BRSV/HRSV en la cual las secuencias N y P anteriormente mencionadas de HRSV estaban transferidas a rBRSV, dando como resultado un rBRSV/A2-NP (Figura 13A). Este empleó los sitios Kpn I y Mlu I anteriormente mencionados.

ES 2 317 914 T3

También se hicieron las mismas transferencias en una cadena principal de rBRSV que contenía los genes NS1 y NS2 de HRSV, a saber: la cadena principal de rBRSV/A2-NS1+2 descrita en el ejemplo previo. Esto dio como resultado los virus rBRSV/A2-NS1+2N, rBRSV/A2-NS1+2P, y rBRSV/A2-NS1+2NP (Figura 13B).

- 5 Cada uno de los virus recombinantes anteriores fue recuperado fácilmente a partir de cDNA. El virus rBRSV/A2-P se replicó en células MDBK comparablemente con el rBRSV de tipo silvestre, mientras que la replicación del rBRSV/A2-N era aproximadamente 10 más baja y que la del virus rBRSV/A2-NP era intermedia entre estas dos. Por tanto, se obtuvo un espectro de propiedades de crecimiento. Siguiendo los métodos descritos anteriormente, estos virus pueden ser modificados para llevar los genes G y F de HRSV. Además pueden hacerse sustituciones de genes 10 comparables en la cadena principal del rHRSV. Concretamente, los genes N y/o P del HRSV pueden estar sustituidos por los correspondientes de BRSV. La capacidad para hacer estas sustituciones en el contexto de sustituciones de los genes NS1 y NS2 ofrece más flexibilidad en obtener un nivel óptimo de producción de vacunas *in vitro* y atenuación e inmunogenicidad en los individuos humanos vacunados.
- 15 Como se ha indicado por los ejemplos anteriores, pueden ser seleccionados genes que han de ser transferidos en RSV con posiciones de genes desplazadas que probablemente interactúen funcionalmente basándose en el conocimiento disponible de estructura/función de los RSV. Estos cambios y otras modificaciones dentro del RSV con posiciones de genes desplazadas se simplifican más por el hecho de que las proteínas que interactúan están yuxtapuestas en el genoma, por ejemplo las proteínas N y P de la nucleocápsida, las proteínas M, SH, F y G de la envolvente y las 20 componentes de polimerasa M2-1 M2-2 y L. Por tanto, pueden conseguirse cepas para vacunas candidatas adicionales como las descritas en la presente memoria, por ejemplo, incorporando dos o más genes yuxtapuestos, por ejemplo, seleccionados de N y P, dos o más de los genes de las proteínas de la envolvente M, SH, F y G, o dos o más de los genes M2-1, M2-2 y L, juntos como una inserción heteróloga o unidad de sustitución en un genoma o antigenoma receptor o de fondo.
- 25 Por ejemplo, los genes M y SH pueden ser reemplazados conjuntamente en rBRSV/A2 con sus equivalentes de HRSV. Esto dará como resultado un virus en el cual las proteínas de la envolvente viral (G, F, SH y M) son todas de HRSV, mientras que las proteínas internas son de BRSV. Esto puede ser seguido, según sea necesario, por reemplazo de genes adicionales de BRSV por sus correspondientes humanos, por ejemplo, N y P como otro par, NS1 y NS2 como 30 otro, y M2-1, M2-2 y L como otro grupo. La yuxtaposición de cada par de genes simplificará las sustituciones. Al mismo tiempo, el método inverso de insertar genes individuales de BRSV genes en HRSV, dejando los determinantes antigenicos G y F de HRSV inalterados, también proporcionará candidatos para vacunas deseados dentro de esta descripción. Por ejemplo, uno o más de los genes N, P, M2-1 y M de un RSV humano pueden ser reemplazados individualmente por sus correspondientes bovinos. Los virus recombinantes recuperados se evalúan luego en cuanto 35 a fenotipo de atenuación en cultivo de células de roedores, y primates no humanos, como se ilustra con ejemplos en la presente memoria. De esta manera, la presente descripción proporciona la identificación de virus para vacunas del RSV químéricos humano-bovinos candidatos que tienen niveles deseados de atenuación y eficacia protectora para tratamiento y profilaxis de enfermedad por RSV en diversos sujetos.

40 Ejemplo VII

Replicación in vitro mejorada de un virus para vacuna del RSV que tienen una delección parcial de genes

- 45 De acuerdo con la descripción anterior, se ha mostrado que la eficacia de replicación *in vitro* del RSV es sensible a cambios en la longitud en nucleótidos del genoma. Con respecto a aumentos en longitud, un tipo de modificación para ajustar el fenotipo de crecimiento del RSV recombinante puede implicar la inserción de un gen adicional que codifica una proteína extraña. Por ejemplo, las secuencias que codifican cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) bacteriana, luciferasa de luciérnaga, gamma-interferón (IFNg) murino, interleuquina 2 (IL-2) murina, y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) han sido insertadas individualmente en la región intergénica G-F. Cada una de estas inserciones tenía el efecto de reducir la eficacia de crecimiento del virus *in vitro*. En un caso, la inserción de un casete de transcripción CAT de aproximadamente 0,76 kb la región intergénica G-F redujo el crecimiento del virus *in vitro* 20 veces. Las linfoquinas eran de origen murino y no era de esperar que fueran activas en las células HEp-2 de origen humano. También, las diversas inserciones de tamaño comparable tenían un efecto de magnitud comparable en reducir el crecimiento del RSV *in vitro*. La inhibición descrita en estos 50 estudios puede ser atribuible a la adición de secuencia *per se*, en oposición a la expresión de las proteínas extrañas codificadas.

- 60 La inserción de un casete de luciferasa de 1,75 kb en la misma región intergénica tuvo mucho mayor efecto inhibidor en la replicación del virus (una reducción mayor de 5 veces), lo que sugiere que las inserciones más grandes son más inhibidoras. Por otro lado, hubo ciertas pruebas de que este efecto también podía depender de la localización de la inserción en el genoma. Por ejemplo, la inserción de un casete de transcripción de 0,8 kb en la región no codificadora del gen NS1, colocándolo en una posición próxima al promotor, solamente tenía un efecto inhibidor marginal sobre el crecimiento del virus (Hallak, *et al.*, *J. Virol.*, 74:10508-13, 2000). Permanece incierto saber si el efecto observado fue debido solo al aumento en la longitud en nucleótidos o si fue debido a la adición de otra unidad codificadora de mRNA o a ambas cosas.

65 En otros ejemplos, los aumentos en la longitud de nts del RSV recombinante se hicieron en una sola región intergénica. Las regiones intergénicas del RSV que existen naturalmente y que han sido analizadas hasta la fecha

varían en longitud desde 1 a 56 nts. En un virus recombinante que carece del gen SH, la región intergénica M-SH se aumentó hasta 160 nts con un efecto inhibidor marginal sobre el crecimiento.

En ejemplos adicionales, el genoma del RSV se disminuyó para proporcionar un efecto deseado sobre el fenotípo viral. En ejemplos seleccionados, uno o más genes del conjunto NS1, NS2, SH, G y M2-2 fueron delecionados individualmente, o en ciertas combinaciones, a partir de virus recombinante sin eliminar la infectividad viral. Cada delección da como resultado una pérdida de expresión de la proteína delecionada, y en la mayoría de los casos dio como resultado una eficacia reducida del crecimiento viral *in vitro* e *in vivo*. La única excepción es que el crecimiento del virus con delección de SH no se redujo *in vitro* y, en algunas líneas celulares, fue aumentado marginalmente. En otro ejemplo que implica la construcción de un virus químérico entre cepas A2 y B1 del RSV, la región intergénica entre los genes G y F fue acortada desde 52 nts a 5 nts (véase, por ejemplo, Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-80, 1999).

Cierto número de publicaciones han estudiado la producción del RSV recombinante con secuencias génicas o intergénicas delecionadas (Birmingham y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:11259-64, 1999; Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 71: 8973-82, 1997; Jin, *et al.*, *Virology*, 273:210-8, 2000; Jin, *et al.*, *J. Virol.*, 74:74-82, 2000; Teng y Collins, *J. Virol.*, 73: 466-473, 1999; Teng, *et al.*, *Journal of Virology*, 2000; Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-42, 1999). Sin embargo, en cada caso la delección fue acompañada por modificación de los marcos de lectura abiertos u otros aspectos genómicos significativos, haciendo incierto el efecto de la delección de nucleótidos sobre el fenotipo viral.

En el presente ejemplo, se demuestra el efecto de reducir la longitud del genoma del RSV delecionando la secuencia de la región no codificadora situada aguas abajo del gen SH. Esta delección parcial de genes ilustrativa (esquemáticamente ilustrada en la Figura 14) se construyó usando una versión del cDNA del antigenoma que contiene un sitio *XmaI* en la región intergénica G-F, un cambio que de por sí mismo no sería de esperar que afectara al virus codificado. La ventana *XhoI-PacI* de 141 pares de bases (pb) que se extiende desde el extremo del ORF del gen SH hasta la señal de fin del gen SH fue reemplazada con un cDNA sintético formado a partir de los siguientes dos oligonucleótidos: TCGAGTtAAAtACtTgaTAAAGTAGTTAAT (SEQ ID NO: 7) y TAACTACTTTAtcAaGTaTTaAC (SEQ ID NO: 8) (partes de los sitios de restricción *XhoI* y *PacI* están en negrita, los nucleótidos del marco de lectura abierto del gen SH y el codón de terminación están subrayados, y los cambios silenciosos de nucleótidos están indicados en letras minúsculas). El virus codificado, que se denominó RSV/6120, tenía sustituciones silenciosas de nucleótidos en los tres últimos codones y el codón de terminación del ORF del gen SH y tiene una delección de 112 nucleótidos desde la región no traducida aguas abajo de SH (posiciones 4499-4610 en el antigenoma recombinante) que deja intacta la señal de fin de gen (Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996) (Figura 14). Estas mutaciones puntuales y la delección de 112 nts no alteraron los aminoácidos codificados de cualquiera de las proteínas virales, no interrumpieron ninguna de las señales de RNA virales conocidas, y no cambiaron el número de RNA codificados.

Los cambios no codificadores en el extremo del gen SH se hicieron porque esta región es susceptible de inestabilidad durante el crecimiento en bacterias. Realmente estos cambios dieron como resultado una estabilidad grandemente mejorada en bacterias, una propiedad que es importante para la manipulación y propagación del plásmido del antigenoma. Por tanto, RSV/6120 proporcionó la oportunidad de examinar el efecto de delecionar secuencia del genoma en ausencia de efectos secundarios y terciarios frustrantes debidos a alteraciones en las proteínas codificadas, señales de RNA, o número de mRNA codificados. Se espera que las cinco mutaciones puntuales hechas en los pocos últimos codones del ORF del SH no afectarán a las propiedades biológicas del virus codificado, manifestadas por estudios de las mutaciones puntuales introducidas como marcadores en diversos genes de los RSV recombinante de la parainfluenza humanos y bovinos de tipo 3 que no están asociados con un cambio significativo en las propiedades biológicas (Collins, *et al.*, *Adv. Virus Res.*, 54:423-51, 1999; Schmidt, *et al.*, *J. Virol.*, 74:8922-9, 2000; Schmidt, *et al.*, *J. Virol.*, 75:4594-603, 2001; Skiadopoulos, *et al.*, *J. Virol.*, 72:1762-8, 1998; Skiadopoulos, *et al.*, *J. Virol.*, 73:1374-81, 1999; Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 72:4467-4471, 1998; Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 73:871-7, 1999).

El virus 6120 fue analizado en cuanto a la eficacia del crecimiento en múltiples etapas en paralelo con su correspondiente de longitud completa, denominado D53 en tres conjuntos separados de infecciones (Figuras 15A, 15B y 15C). Como se muestra en las Figuras, el título máximo del virus 6120 fue reproduciblemente mayor que el del virus D53 en un factor de 1,5 a 2 veces. Por tanto, las modificaciones hechas en el gen SH, en particular la delección no codificadora de 112 nts (que representa 0,7% de la longitud del genoma), dio como resultado un aumento sustancial en eficacia de crecimiento *in vitro*. Cualquier aumento en la eficacia de crecimiento *in vitro* es una ventaja para la producción de vacunas del RSV, puesto que el crecimiento relativamente no robusto que es característico del RSV es un importante problema para el desarrollo de vacunas y se anticipa que es una complicación para la de producción vacunas.

Las modificaciones específicas definidas descritas en el presente ejemplo proporcionan una herramienta general que puede ser aplicada en una variedad de contextos para optimizar el crecimiento del virus de vacuna recombinante y otras características fenotípicas. Basándose en los presentes hallazgos el genoma de 15,2 kb del RSV proporciona un gran ensamblamiento de sitios dianas para la modificación por delección parcial de genes u otras delecciones de nucleótidos. Típicamente los cambios que han de ser seleccionados a este respecto no implicarán los 11 ORF virales y sus sitios de comienzo de la traducción (véase, por ejemplo, Kozak, *Gene*, 234:187-208, 1999). Los ORF virales dan cuenta de más del 90% del genoma, y por tanto la selección típica de sitios diana para la modificación por delección parcial estará dentro de las regiones no traducidas restantes (alternativamente denominadas regiones no codificadoras). Además los sitios diana para delecciones de nucleótidos a esta respecto generalmente excluirán señales de replicación y transcripción de acción cis, incluyendo la señal de comienzo de gen de 10 nts y la señal de fin de gen de 12 a 13 nts

ES 2 317 914 T3

que flanquean cada gen (véase, por ejemplo, Collins, *et al*, *Fields Virology*, 2:1313-1352, 1996), así como un promotor de núcleo de 11 nts que se encuentra en el extremo 3' del genoma y el complemento del promotor antigenómico que se encuentra en el extremo 5' del genoma.

5 El presente ejemplo ilustra que, inesperadamente, la eficacia del crecimiento *in vitro* por RSV puede ser aumentada sustancialmente eliminando secuencias no traducidas, tales como las secuencias que flaquean los ORF virales o las situadas entre o después de los genes o en las regiones extragénicas 3' y 5'. El ejemplo demuestra que incluso pequeñas delecciones de secuencia pueden proporcionar un crecimiento viral mejorado. Esto es un resultado altamente deseable, puesto que la mejora de la eficacia de crecimiento *in vitro* facilita el desarrollo y producción de vacunas a gran escala.

10 Información sobre el depósito de microorganismos

Los siguientes materiales han sido depositados en *The American Type Culture Collection*, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, de acuerdo con las condiciones del Tratado de Budapest y denominados como sigue:

Plásmido	Nº de acceso	Fecha de depósito
cpts RSV 248	ATCC VR 2450	22 de marzo de 1994
cpts RSV 248/404	ATCC VR 2454	22 de marzo de 1994
cpts RSV 248/955	ATCC VR 2453	22 de marzo de 1994
cpts RSV 530	ATCC VR 2452	22 de marzo de 1994
cpts RSV 530/1009	ATCC VR 2451	22 de marzo de 1994
cpts RSV 530/1030	ATCC VR 2455	22 de marzo de 1994
RSV B-1 cp52/2B5	ATCC VR 2542	26 de septiembre de 1996
RSV B-1 cp-23	ATCC VR 2579	15 de julio de 1997
p3/7(131)	ATCC 97990	18 de abril de 1997
p3/7(131)2G	ATCC 97989	18 de abril de 1997
p218(131)	ATCC 97991	18 de abril de 1997

35

Los ejemplos anteriores se presentan como ilustración y no como limitación de las reivindicaciones adjuntas.

40

45

50

55

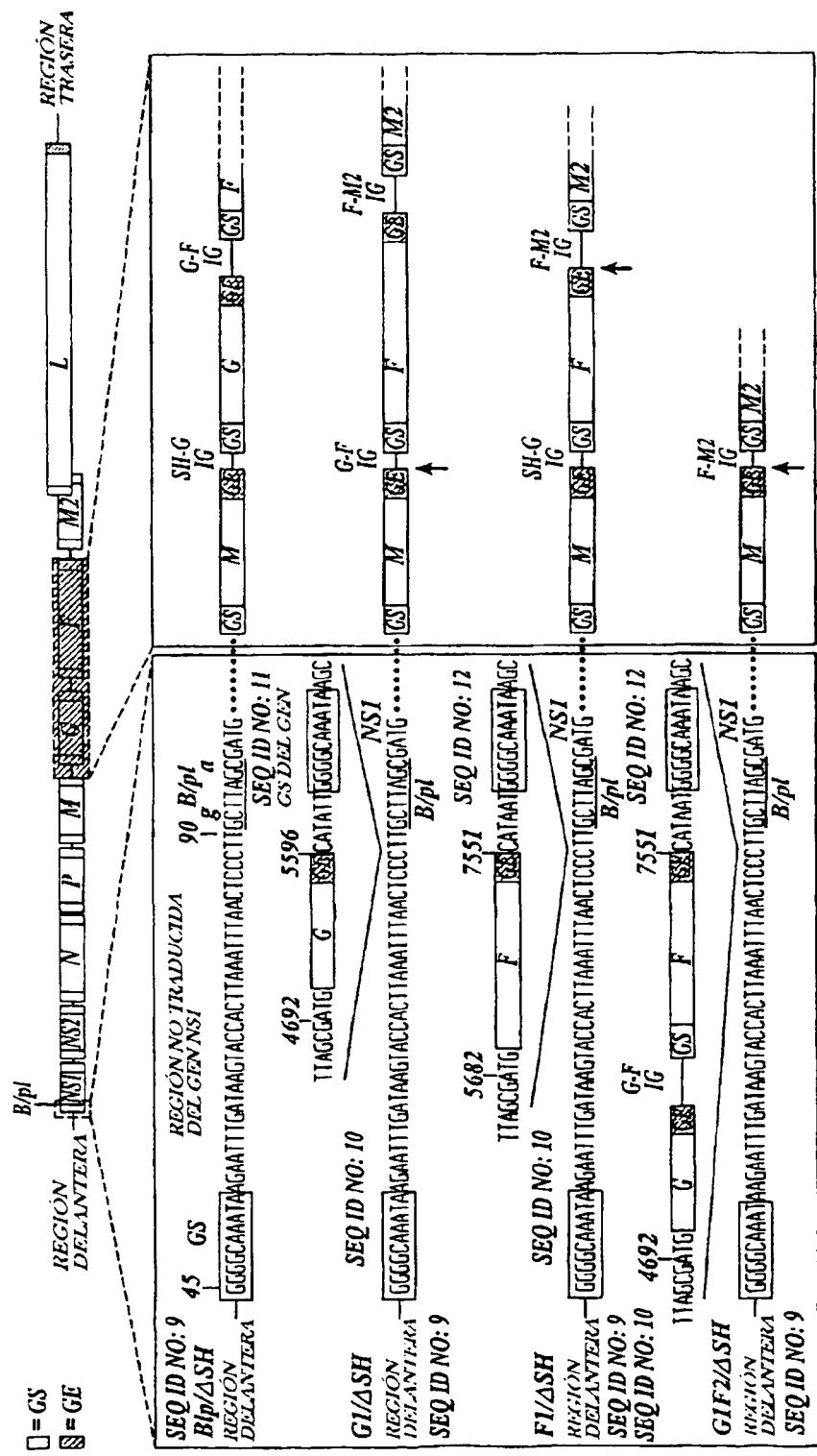
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus sincitial respiratorio (RSV) recombinante e infeccioso, que comprende una proteína (N) principal de la nucleocápsida, una fosfoproteína (P) de la nucleocápsida, una proteína (L) polimerasa grande, un factor de prolongación de RNA-polimerasa, y un genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo, en donde un gen de glicoproteína en dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo está desplazado posicionalmente a la posición 1, respecto al promotor.
- 10 2. Un polinucleótido aislado que comprende un genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo, en donde un gen de glicoproteína en dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo está desplazado posicionalmente a la posición 1, respecto al promotor.
- 15 3. El RSV recombinante e infeccioso de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 2, en donde dicho gen de glicoproteína es un gen G.
- 20 4. El RSV recombinante e infeccioso de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 2, en donde dicho gen de glicoproteína es un gen F.
- 25 5. El RSV recombinante e infeccioso de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 2, en donde el gen la glicoproteína G del RSV está desplazado a la posición 1 de orden del gen y el gen F de la glicoproteína RSV está desplazado a la posición 2 de orden del gen dentro de dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo.
- 30 6. El RSV recombinante infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un gen SH está delecionado de dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo.
- 35 7. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un gen NS2 está delecionado de dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo.
- 40 8. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes 7, en donde un gen SH del RSV y un gen NS2 del RSV están delecionados formando el genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo.
- 45 9. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes 7, en donde un gen NS1 y un gen NS2 están delecionados de dicho genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo.
- 50 10. El RSV recombinante e infeccioso de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 2, en donde un gen SH, un gen NS1 y un gen NS2 del RSV están delecionados formando el genoma o antigenoma del RSV recombinante parcial o completo.
- 55 11. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la transcripción de dicha glicoproteína está sobre-regulada.
- 60 12. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho genoma o antigenoma recombinante está atenuado.
- 65 13. El RSV recombinante e infeccioso de la reivindicación 12, en donde dicha atenuación resulta de mutaciones puntuales sensibles a la sensible a la temperatura, mutaciones puntuales no sensibles a la temperatura o deleciones de genes.
- 70 14. El RSV recombinante e infeccioso de la reivindicación 1 o el polinucleótido aislado de la reivindicación 2, en donde el genoma o antigenoma recombinante parcial o completo comprende un genoma o antigenoma de fondo del RSV humano (HRSV) o RSV bovino (BRSV) parcial o completo combinado con uno o más gen(es) o fragmentos de genoma heterólogo(s) de un RSV diferente formando un genoma o antigenoma del RSV químérico humano-bovino.
- 75 15. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de cualquiera de la reivindicación 14, en donde ambos genes de las glicoproteínas G y F del RSV humano están sustituidos en el orden de las posiciones de genes 1 y 2, respectivamente, reemplazando a los genes de las glicoproteínas G y F equivalentes delecionados en las posiciones 7 y 8 de tipo silvestre, respectivamente en un genoma o antigenoma de fondo del RSV bovino parcial.
- 80 16. El RSV recombinante e infeccioso o el polinucleótido aislado de la reivindicación 15, en donde los genes NS1 and NS2 del RSV humano están sustituidos por sus genes equivalentes bovinos en un genoma o antigenoma de fondo del RSV bovino parcial.

Fig. 1. GENOMA DEL *Bp/ΔSH*



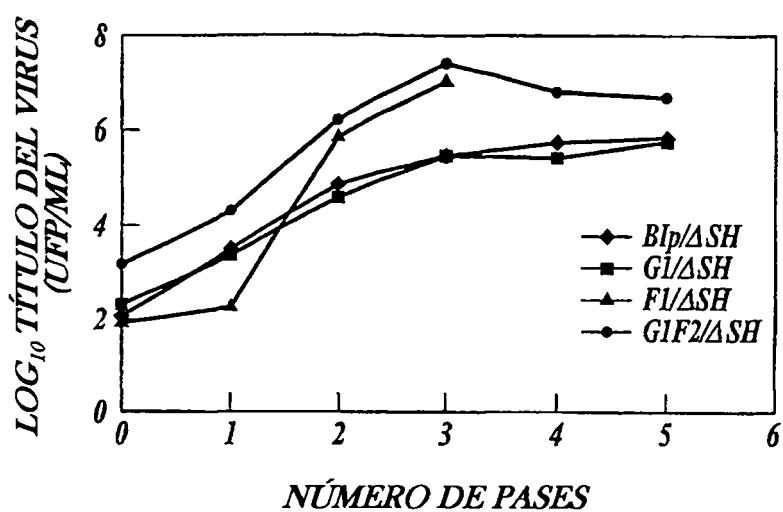


Fig. 2.

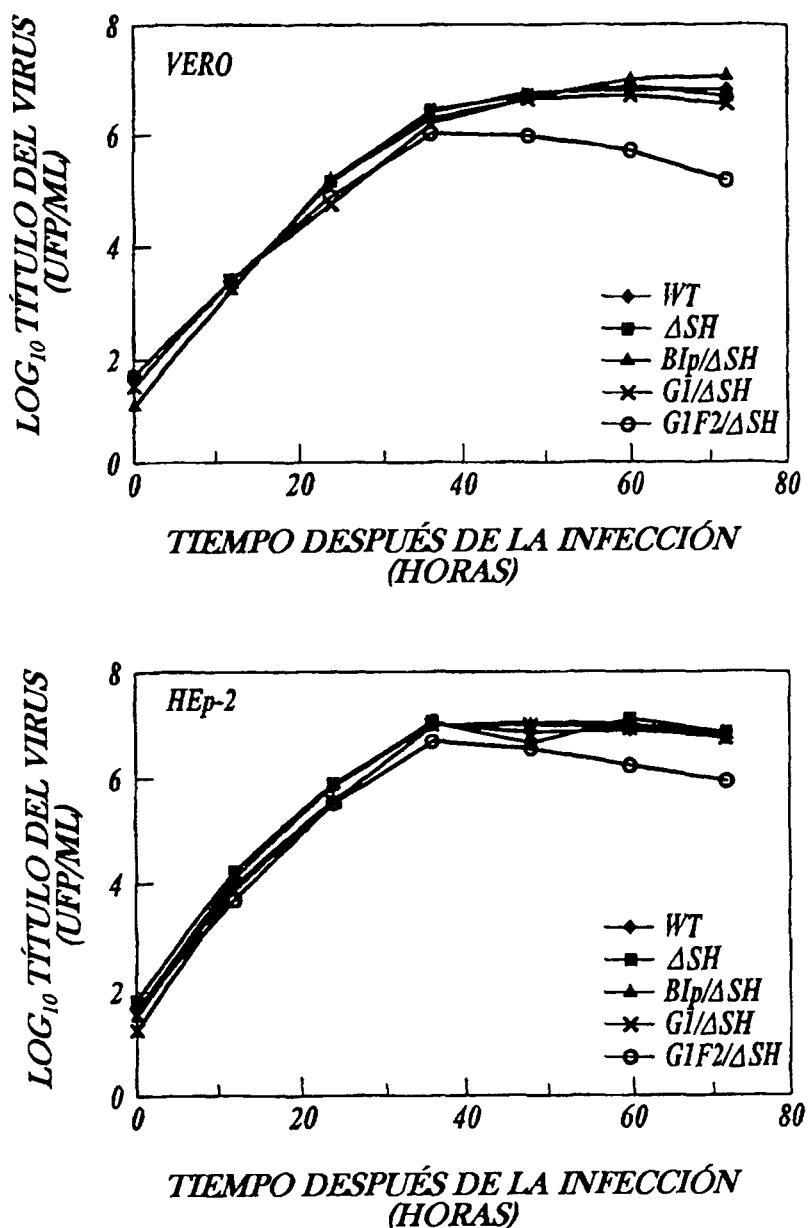


Fig. 3A.

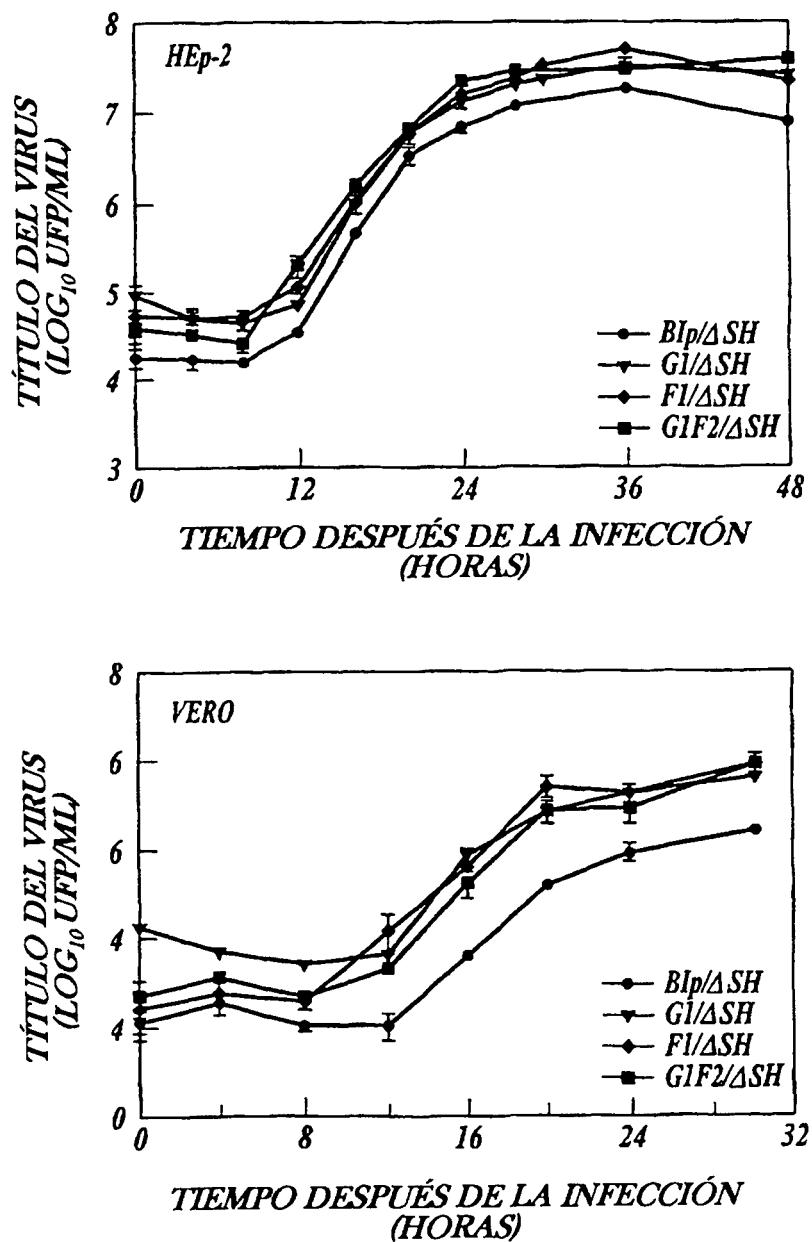


Fig. 3B.

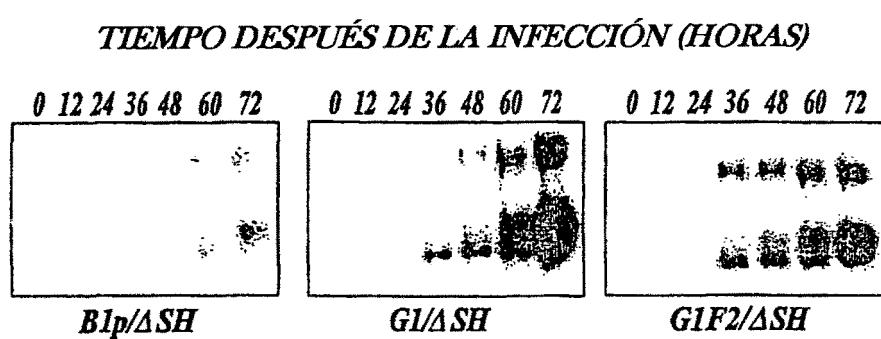
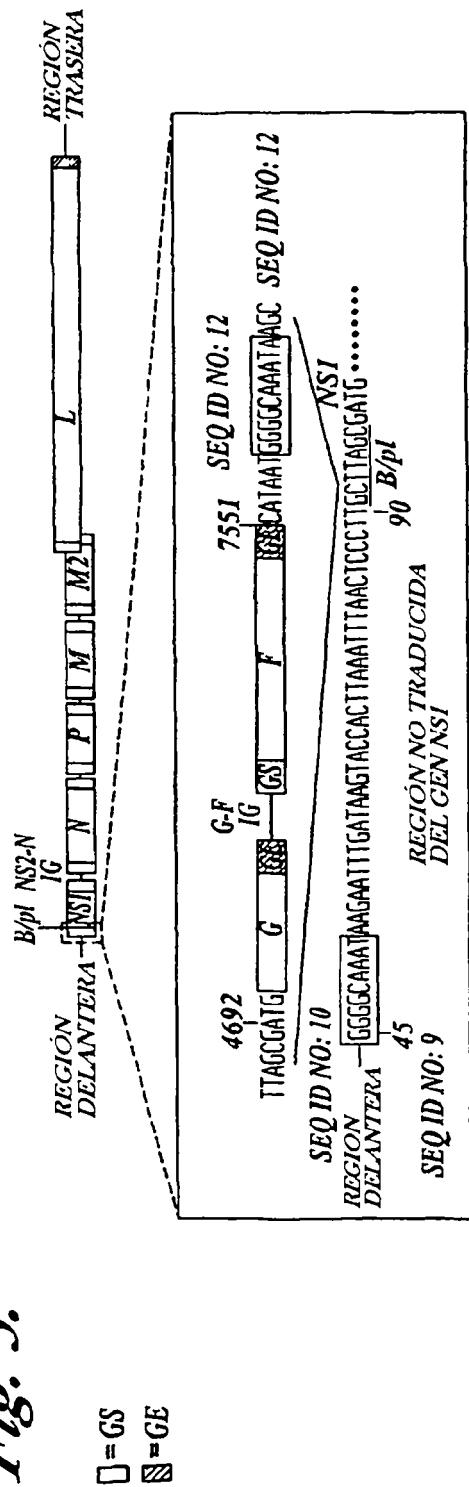


Fig. 4.

Fig. 5.

PANEL A. GENOMA DE RSV G1F2/ΔNS2



PANEL B. GENOMA DE RSV G1F2/ΔNS1ΔNS2

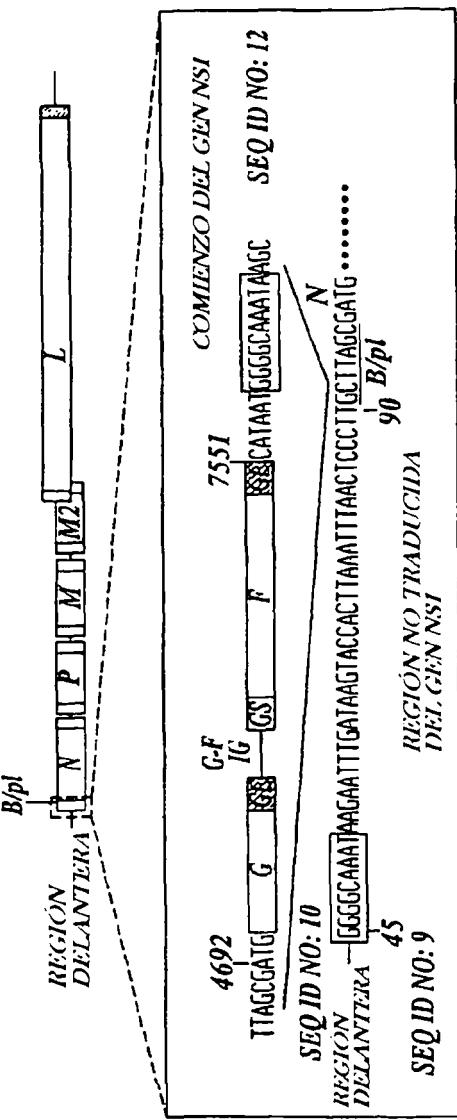
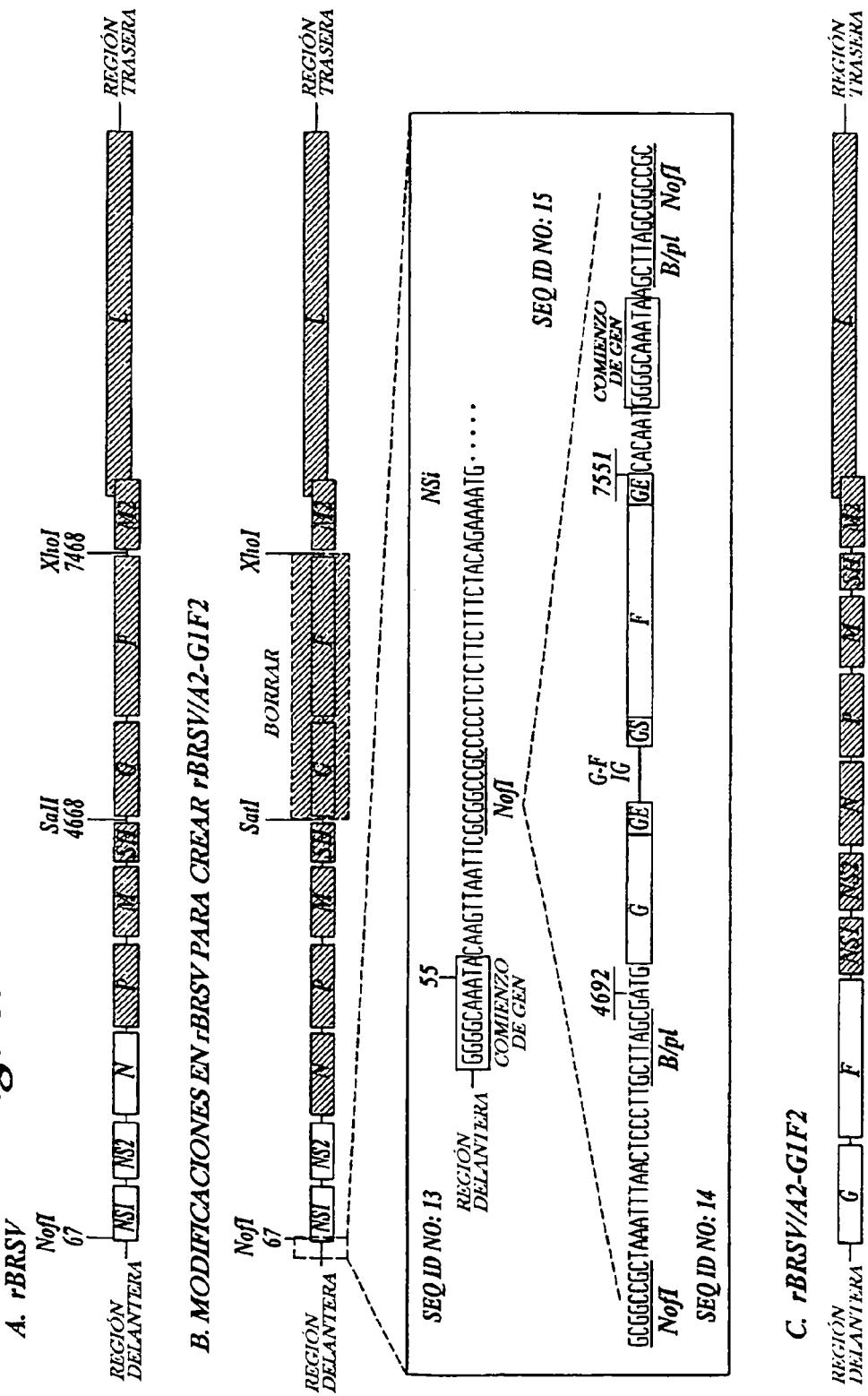
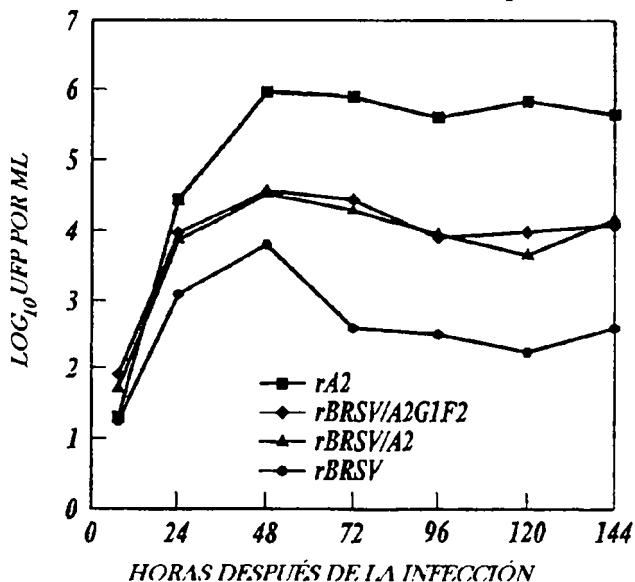


Fig. 6.



*CRECIMIENTO EN CICLOS MÚLTIPLES
DE rA2, rBRSV/A2G1F2, rBRSV/A2,
Y rBRSV EN CELULAS HEp-2*



*CRECIMIENTO EN CICLOS MÚLTIPLES
DE rA2, rBRSV/A2G1F2, rBRSV/A2,
Y rBRSV EN CELULAS MDEK*

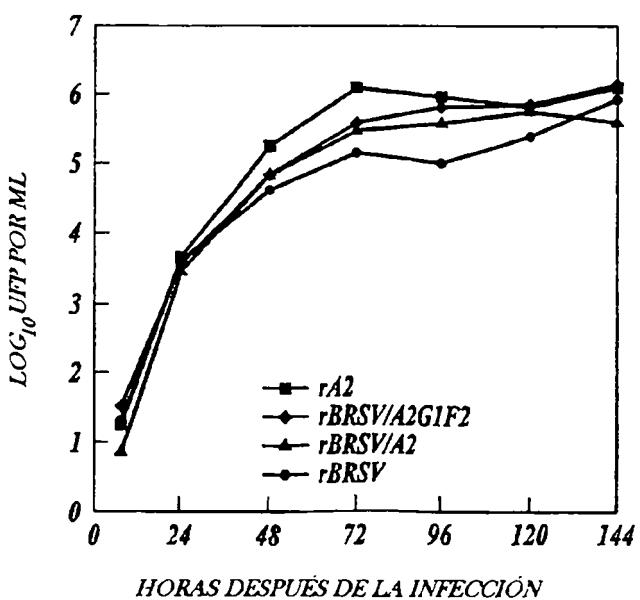


Fig. 7.

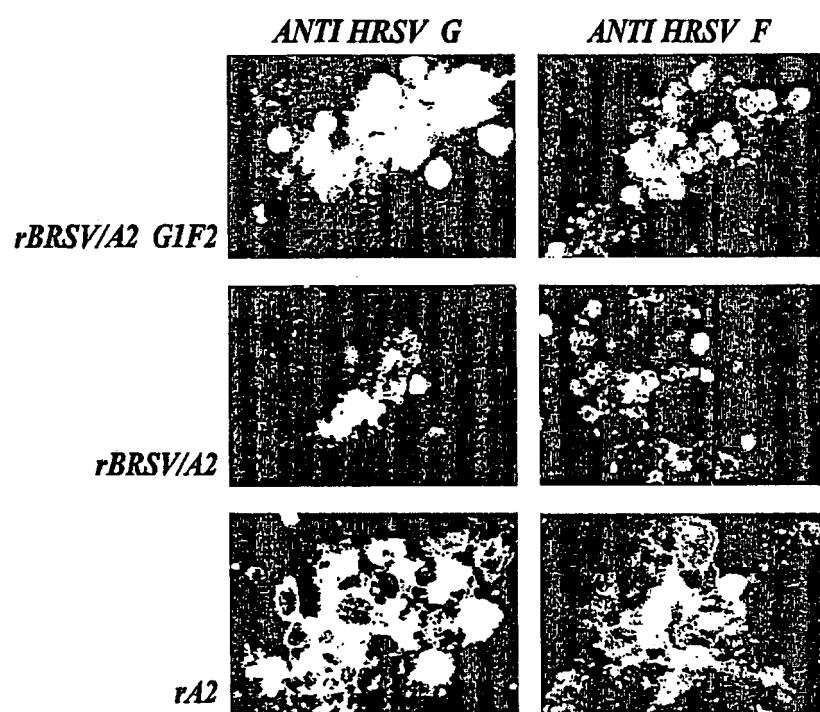


Fig. 8.

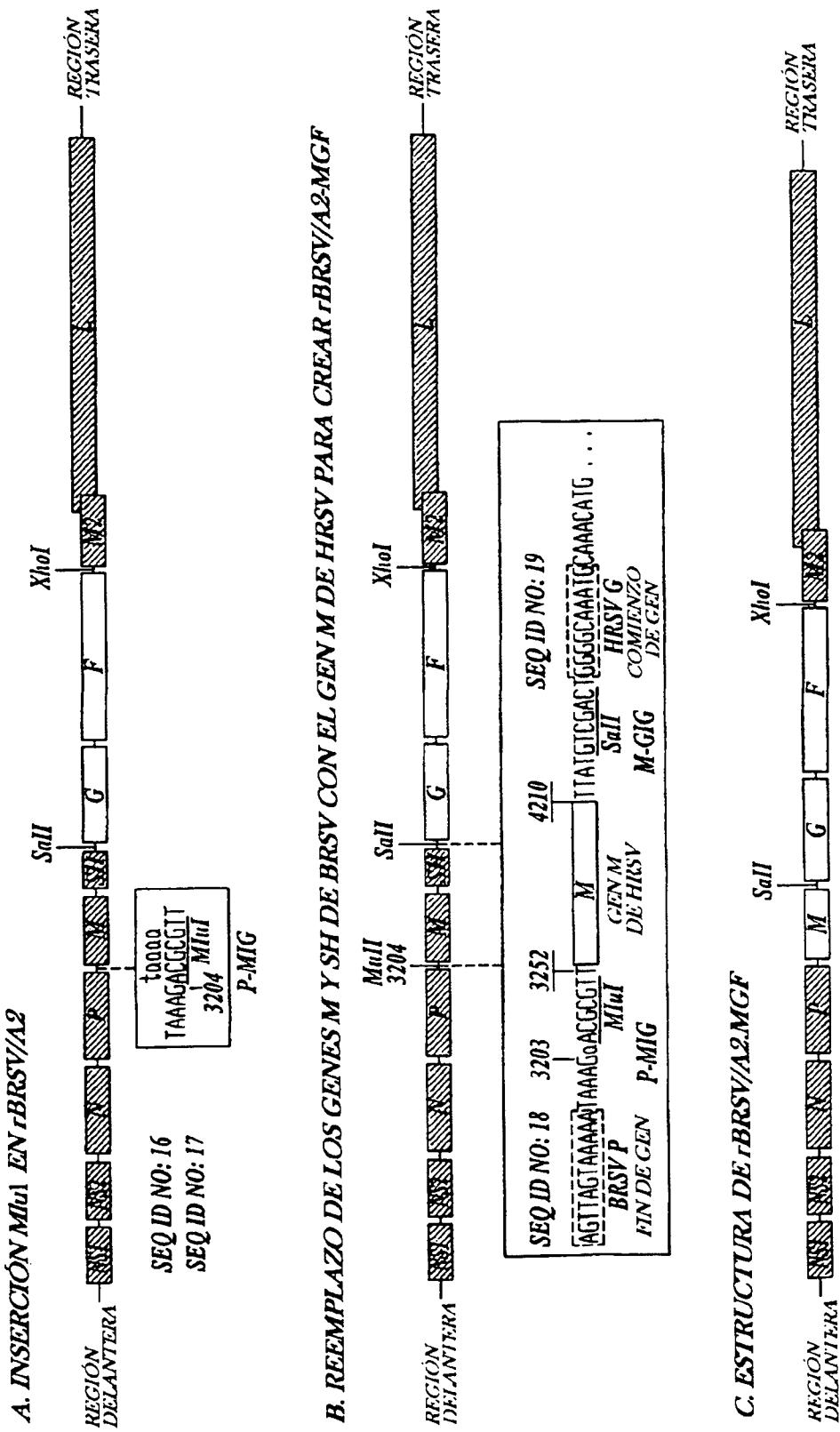
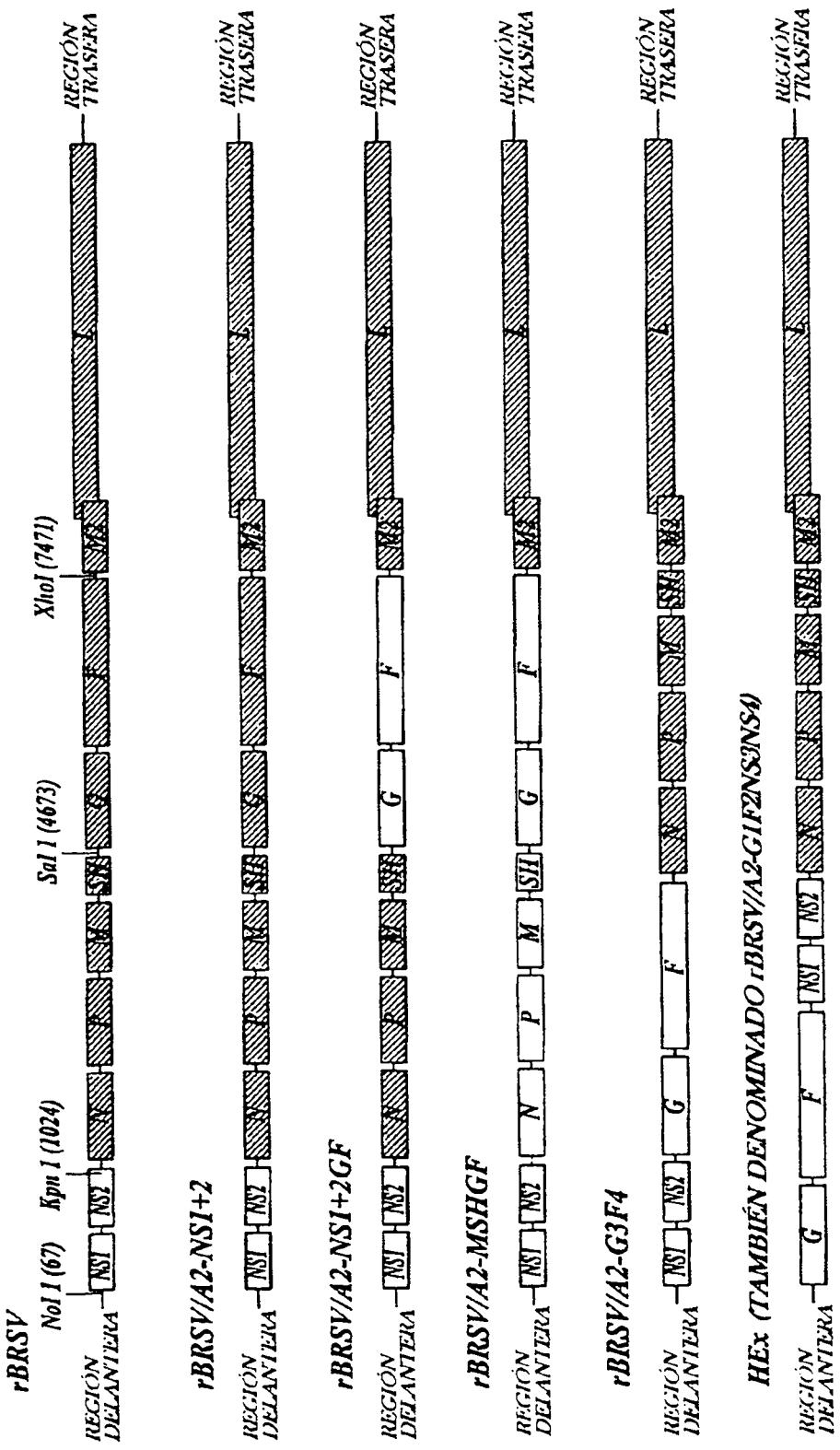
Fig. 9.

Fig. 10.



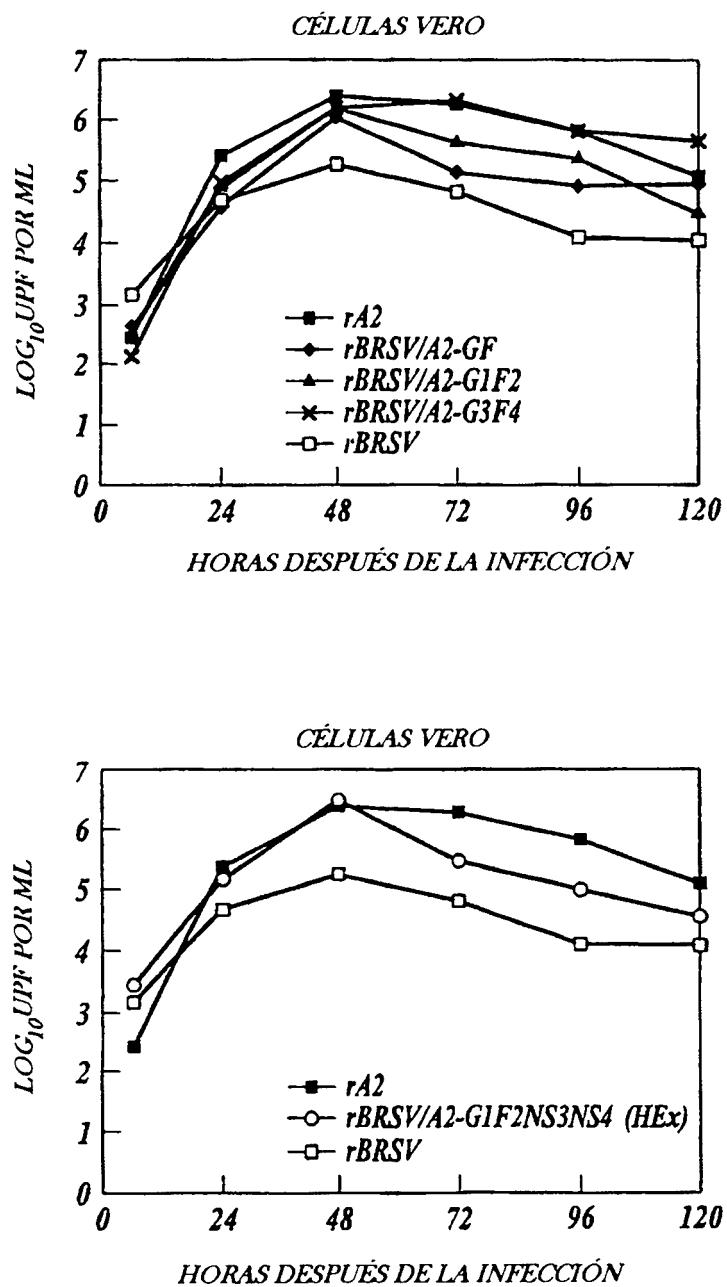


Fig. 11.

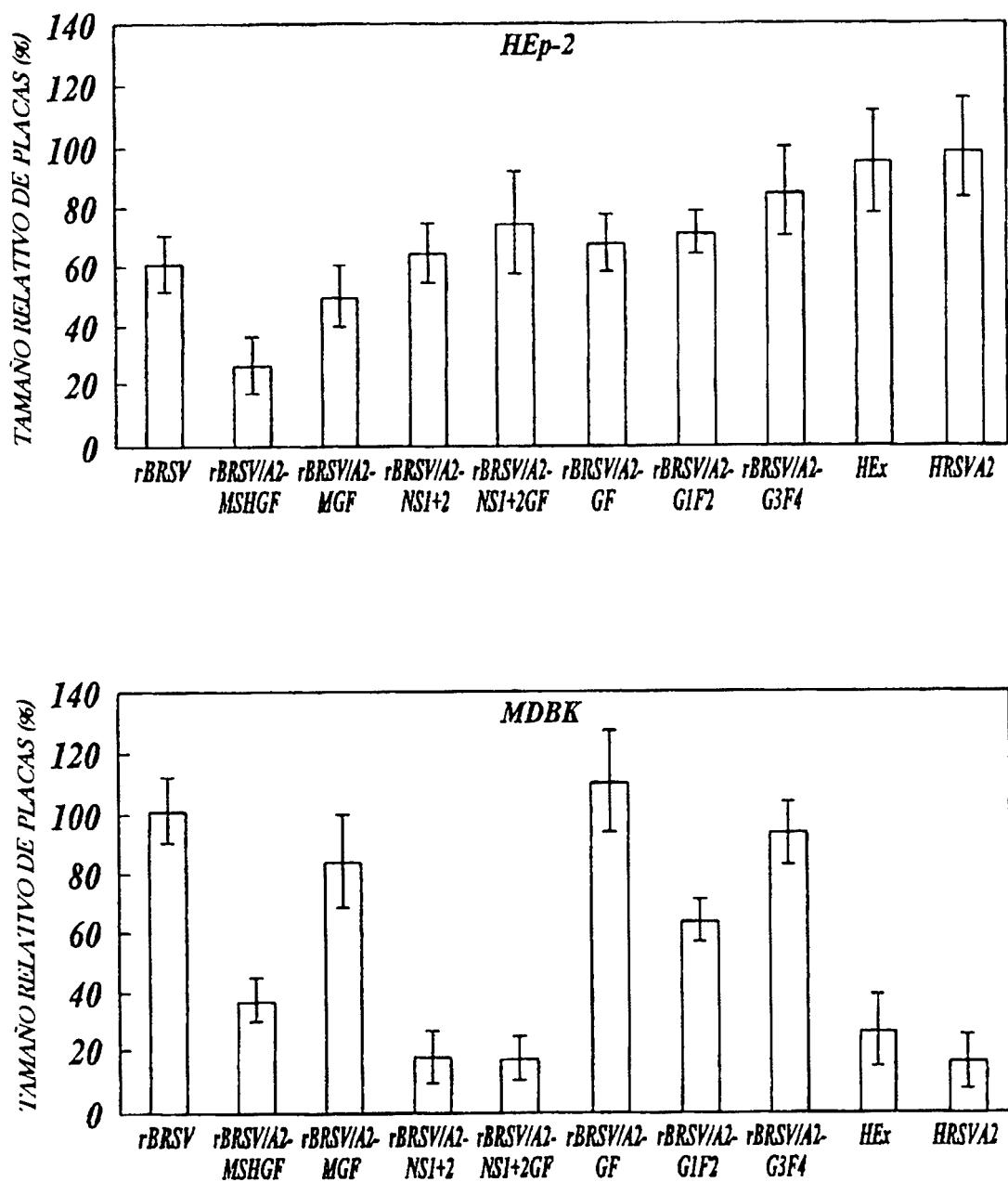


Fig. 12.

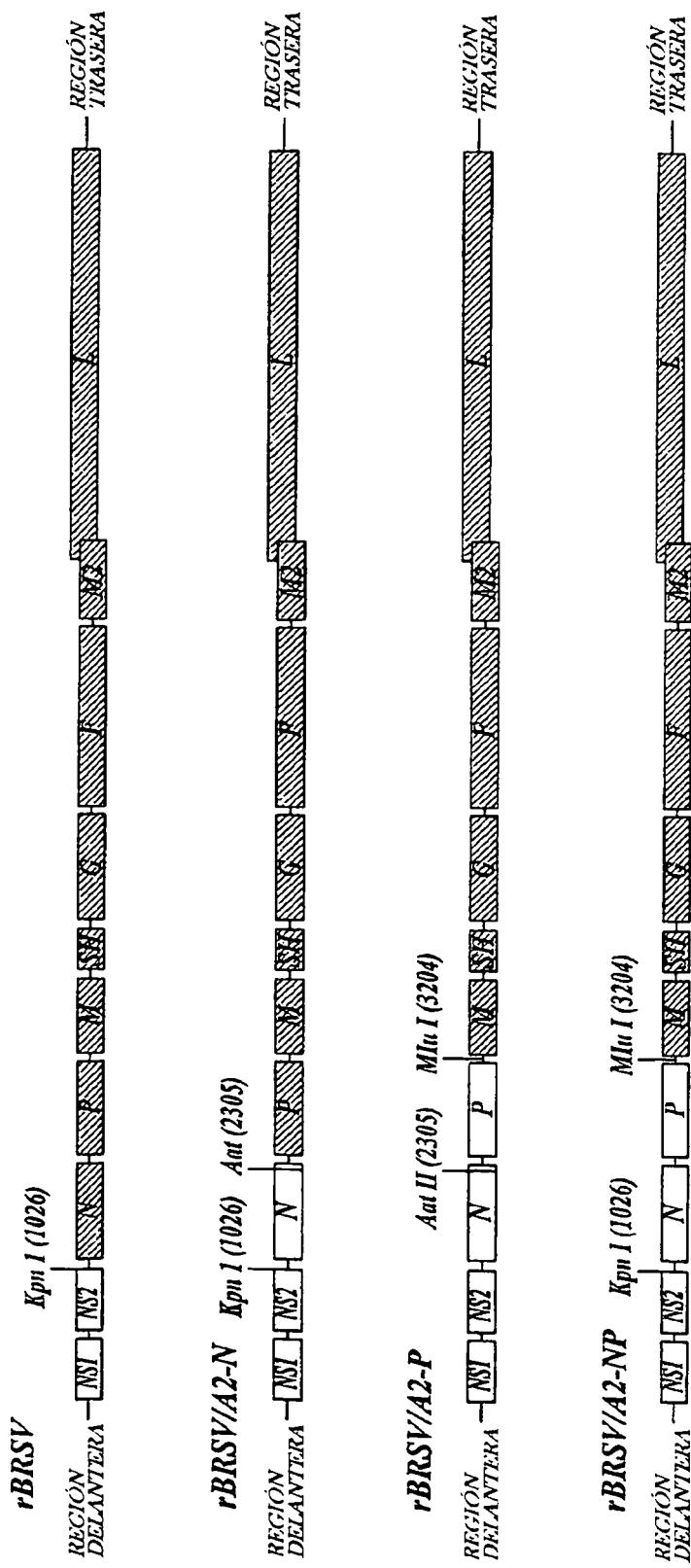
Fig. 13A.

Fig. 13B.

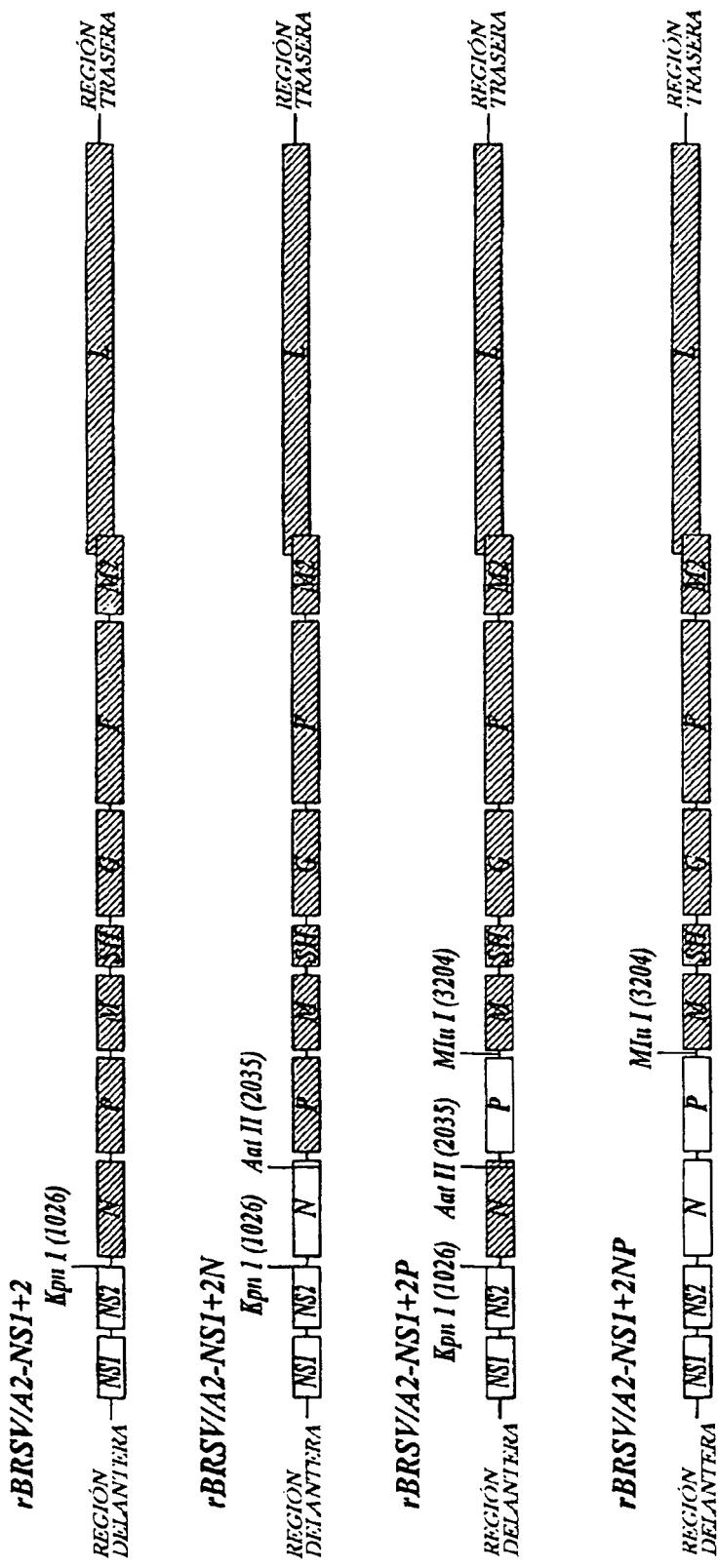
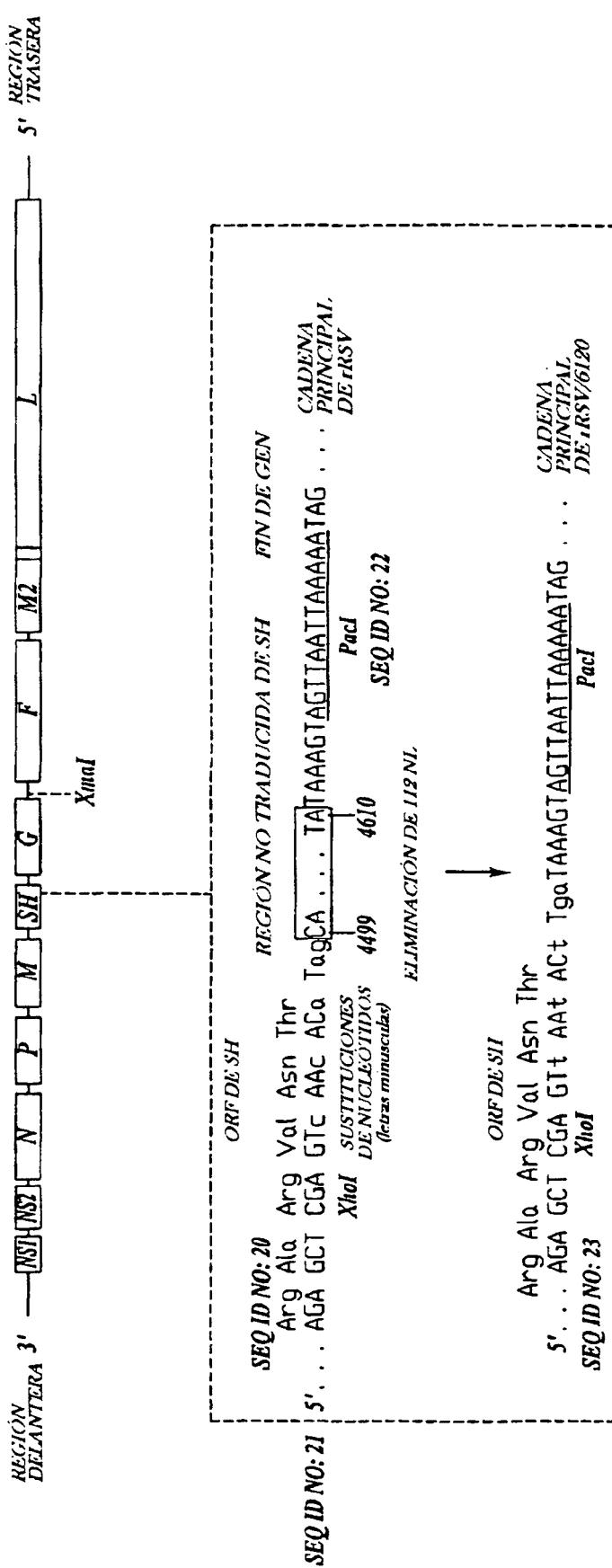
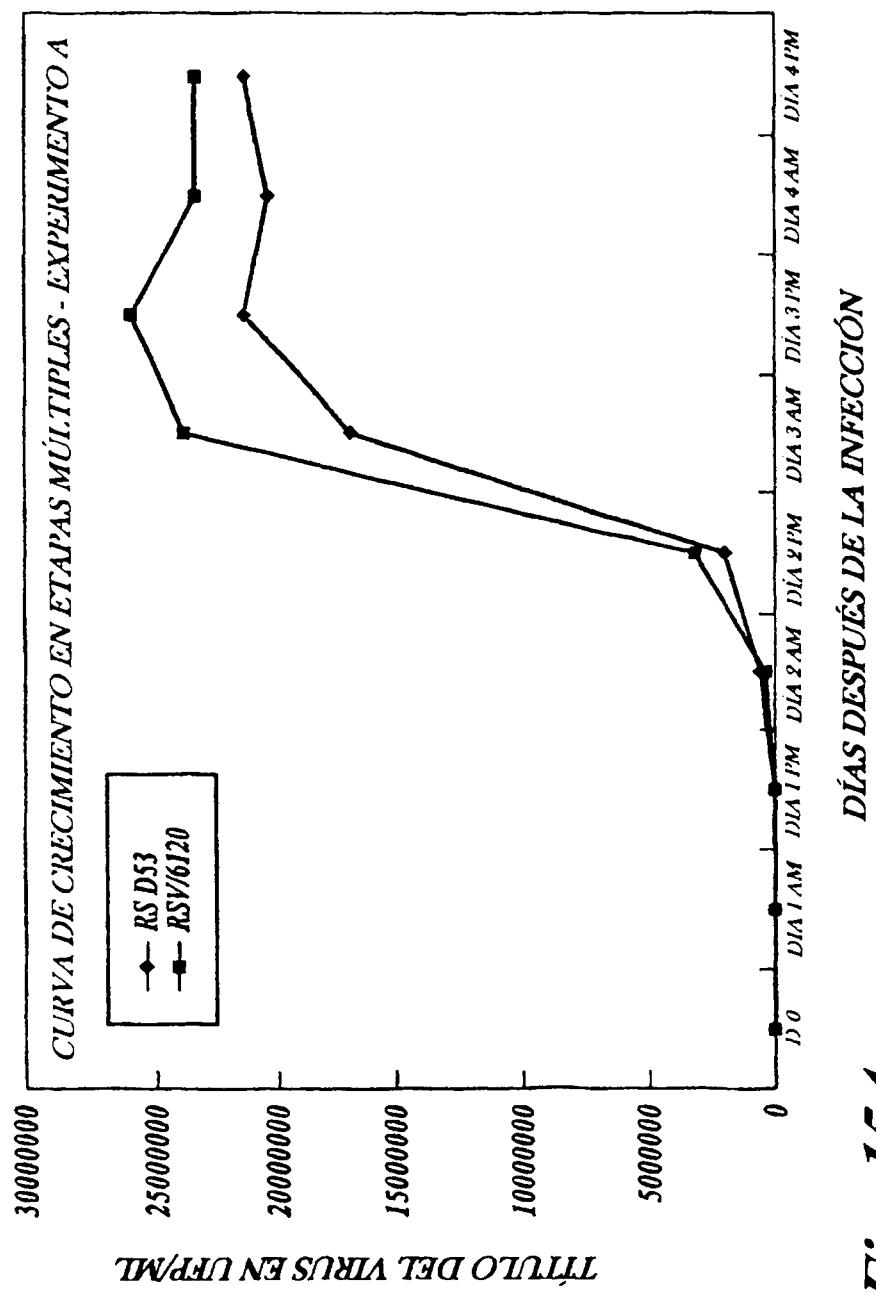
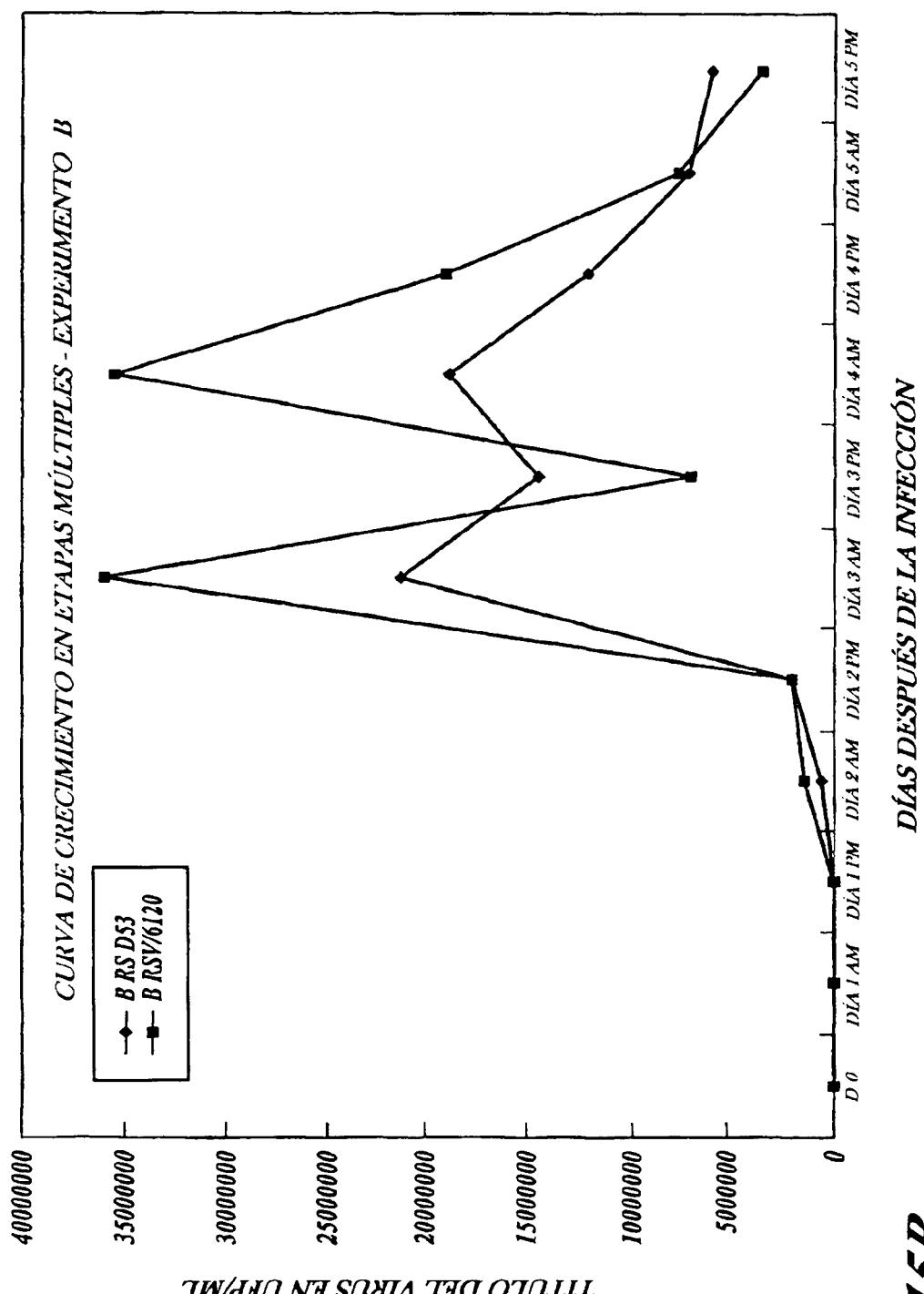
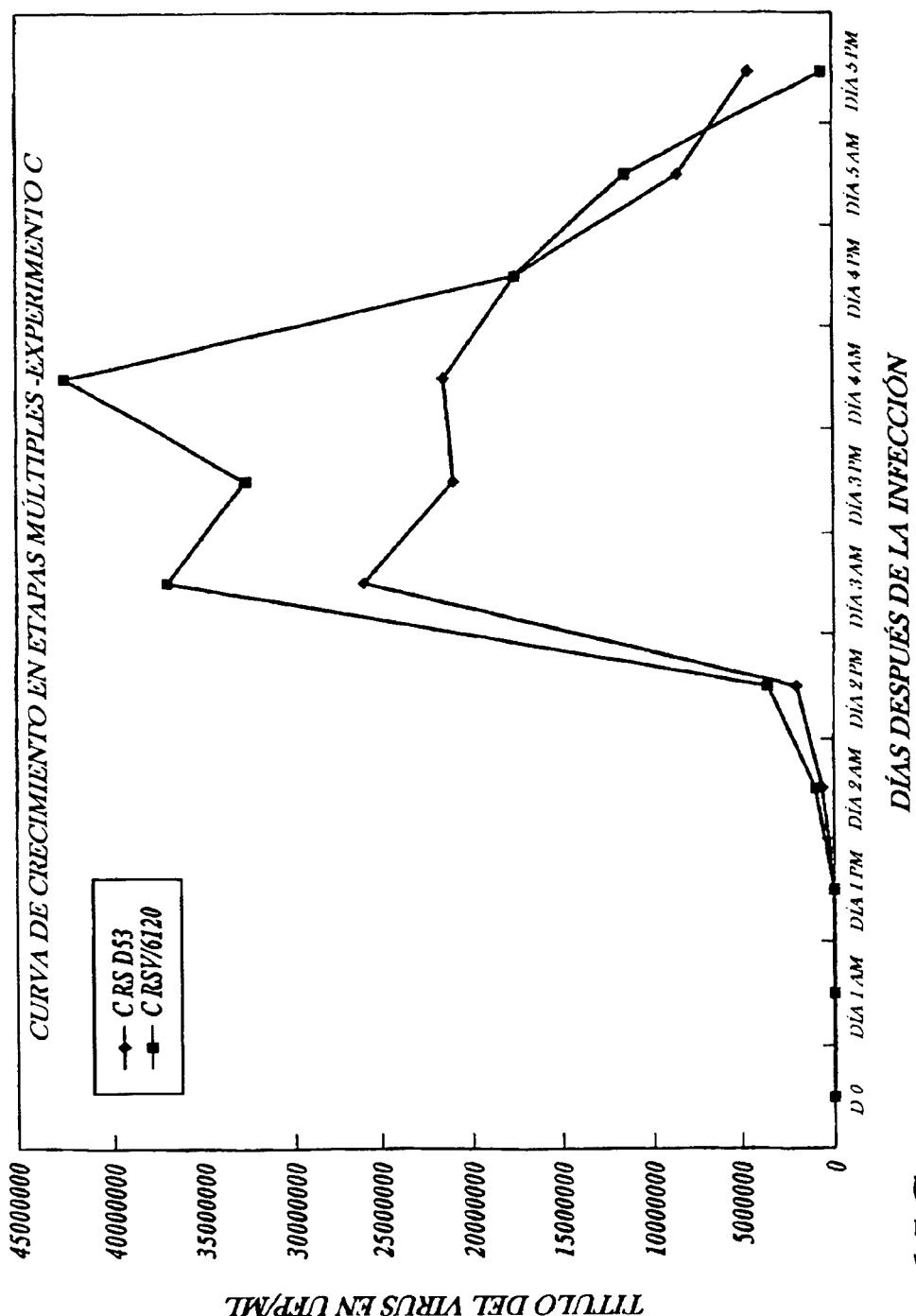


Fig. 14.

*Fig. 15A.*

*Fig. 15B.*

*Fig. 15C.*