

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 387**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/45 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2014 PCT/US2014/015274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14124238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2014 E 14706207 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2023 EP 2954049**

54 Título: **Atenuación del virus respiratorio sincitial humano mediante la desoptimización de pares de codones a escala genómica**

30 Prioridad:

08.02.2013 US 201361762768 P

15.03.2013 US 201361794155 P

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

31.10.2023

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (33.3%)
National Institutes of Health 6011 Executive Boulevard Suite 325 MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US;
MUELLER, STEFFEN (33.3%) y
WIMMER, ECKARD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MUELLER, STEFFEN;
WIMMER, ECKARD;
COLLINS, PETER, L.;
LE NOUËN, CYRIL;
BROCK, LINDA, G.;
BUCHHOLZ, URSULA, J. y
DINAPOLI, JOSHUA, MARC**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 952 387 T3

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

DESCRIPCIÓN

Atenuación del virus respiratorio sincitial humano mediante la desoptimización de pares de codones a escala genómica

5 **CAMPO TÉCNICO**

La materia divulgada en el presente documento se refiere a paramixovirus, en particular, el virus respiratorio sincitial y cepas mutantes atenuadas del mismo.

10 **ANTECEDENTES**

El virus respiratorio sincitial humano (RSV) infecta a casi todo el mundo al principio de la vida y es responsable de una mortalidad y morbilidad considerables. Sólo en Estados Unidos, el RSV es responsable de entre 75.000 y 125.000 hospitalizaciones al año, y en todo el mundo las estimaciones más conservadoras concluyen que el RSV es responsable de 64 millones de infecciones pediátricas y 160.000 muertes pediátricas. Otra característica inusual del RSV es que la infección grave en la infancia puede ir seguida de años de disfunción de las vías respiratorias, incluyendo una predisposición a la reactividad de las vías respiratorias. La infección por RSV exacerba el asma y puede estar implicada en su inicio.

El RSV pertenece a la familia Paramyxoviridae y, como tal, es un virus envuelto que se replica en el citoplasma y madura por gemación a través de la membrana plasmática de la célula huésped. El genoma del RSV es una única cadena de ARN de sentido negativo de 15,2 kilobases que la polimerasa viral transcribe en 10 ARNm mediante un mecanismo de parada y arranque secuencial que se inicia en un único promotor viral en el extremo 3' del genoma. Cada ARNm codifica una única proteína principal, a excepción del ARNm M2, que tiene dos marcos de lectura abiertos superpuestos que codifican dos proteínas distintas. Las 11 proteínas del RSV son: la proteína nucleocápside de unión al ARN (N), la fosfoproteína (P), la gran proteína polimerasa (L), la glicoproteína de unión (G), la proteína de fusión (F), la pequeña glicoproteína hidrófoba (SH) de superficie, la proteína de matriz interna (M), las dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, y las proteínas M2-1 y M2-2 codificadas por el ARNm M2. El orden de los genes del RSV es: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L. Cada gen está flanqueado por señales de transcripción cortas denominadas señal de inicio del gen (GS), presente en el extremo ascendente del gen e implicada en el inicio de la transcripción del gen respectivo, y señal de final del gen (GE), presente en el extremo corriente abajo del gen e implicada en dirigir la síntesis de una cola de poliA seguida de la liberación del ARNm.

Existen vacunas y nuevos fármacos antivirales en fase de desarrollo preclínico y clínico; sin embargo, aún no se dispone comercialmente de vacunas contra el RSV. El objetivo del presente estudio era diseñar y generar nuevas vacunas candidatas contra el RSV utilizando la técnica de modificación sintética de virus atenuados (SAVE) descrita recientemente. (Coleman, et al., Science 320:1784-1787 (2008)). Esta técnica se utiliza para recodificar un genoma en el que la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (wt) no se modifica, pero los codones sinónimos se reorganizan para crear una disposición subóptima de pares de codones que se desvía de la frecuencia natural de aparición de ciertos pares de codones. En el caso de los patógenos, la atenuación resultante de esta reordenación de codones puede "valorarse" ajustando el grado de desoptimización de pares de codones (CPD). Los patógenos recombinantes atenuados por este procedimiento codifican proteínas con secuencias de aa wt. Así pues, es probable que estos patógenos induzcan una inmunidad celular y humoral contra los mismos epítomos que el patógeno wt.

El documento WO 2006/042156 divulga polinucleótidos RSV recombinantes que codifican RSV y tienen genes G y F de codón optimizado.

El documento WO 2010/053883 divulga una cepa humana atenuada de RSV-A obtenida por pasaje en serie.

Buchholz et al., Journal of Virology, vol. 74, no.3 (2000) enseña el uso de una cepa BRSV para la expresión de proteínas F y G derivadas de RSV humano.

SUMARIO

La invención proporciona un polinucleótido recombinante que codifica un virus respiratorio sincitial (RSV) humano atenuado del subgrupo A, en el que el polinucleótido recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína L del RSV, en la que la proteína L del RSV tiene una secuencia de aminoácidos que difiere como máximo en un residuo de aminoácido de una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L de RSV es de 75 % a 85 % idéntica a los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV ha sido desoptimizada por pares de codones, en la que el sesgo de pares de codones de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV se ha reducido en al menos 0,2 con respecto a los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1, en el que el RSV humano atenuado del subgrupo A se replica al menos 100 veces menos que el RSV de tipo silvestre en el tracto respiratorio inferior de los monos verdes africanos, y en el que el RSV humano atenuado del subgrupo A induce anticuerpos neutralizantes en los monos verdes africanos.

La invención también proporciona un genoma humano atenuado recombinante del RSV del subgrupo A que comprende el polinucleótido recombinante de la invención; o un antigenoma correspondiente que comprende un polinucleótido complementario al polinucleótido recombinante.

5 La invención también proporciona un genoma humano atenuado recombinante del RSV del subgrupo A que comprende el polinucleótido recombinante de la invención, en el que la secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 4 opcionalmente modificado para codificar una o más de las siguientes mutaciones: K136R en la proteína N, E114V en la proteína P y N88K en la proteína M2-1, o SEQ ID NO: 5; o un antigenoma correspondiente que comprenda un polinucleótido complementario al polinucleótido recombinante.

10 La invención también proporciona un RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A que comprende el genoma del RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A de la invención.

15 La invención también proporciona un procedimiento para producir un RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A, que comprende expresar el genoma del RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A de la invención en una célula.

20 La invención también proporciona un RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A de la invención para su uso en terapia.

La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende el RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A de la invención.

25 En el presente documento se describen secuencias polinucleotídicas de RSV que hacen uso de múltiples codones que contienen sustituciones nucleotídicas silenciosas diseñadas en múltiples ubicaciones del genoma, en las que las sustituciones introducen numerosos codones sinónimos en el genoma. Esta sustitución de codones sinónimos altera diversos parámetros, incluyendo el sesgo de codones, el sesgo de pares de codones, la densidad de codones desoptimizados y pares de codones desoptimizados, la estructura secundaria del ARN, el contenido de dinucleótidos CpG, el contenido de C+G, los sitios de cambio de marco de traducción, los sitios de pausa de traducción, la presencia o ausencia de secuencias de reconocimiento de microARN específicas de tejido, o cualquier combinación de las mismas, en el genoma. Debido al gran número de defectos implicados, el virus atenuado de la invención proporciona un medio para producir vacunas vivas atenuadas de forma estable contra el RSV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 **Figura 1. Generación de rRSVs sintéticos desoptimizados en pares de codones y caracterización de su crecimiento en células Vero.** (A) Se generaron cuatro rRSV quiméricos sintéticos desoptimizados en pares de codones (CPD) a partir de la columna vertebral del RSV wt (número de acceso Genbank M74568). Min A contenía CPD ORFs de NS 1, NS2, N, P, M y SH. Min B contenía CPD ORFs de G y F. Min L contenía un CPD ORF de la proteína polimerasa L. Min FLC, todas las regiones codificantes excepto M2, fueron desoptimizadas por pares de codones. Las secuencias codificantes CPD y wt están representadas por recuadros sombreados en negro o gris, respectivamente. (B) Cinética de crecimiento multiciclo de rRSVs wt y desoptimizados en pares de codones en células Vero a 32 y 37°C. (C) Fenotipo del tamaño de la placa en células Vero a 32°C de los rRSV y los CPD rRSV. (D) La infectividad específica de los CPD rRSV en relación con el rRSV se evaluó mediante qRT-PCR de cadena específica (Bessaud, M., et al., 2008. J Virol Methods 153:182-189). Los ARN virales derivados de 4×10^6 ufp de rRSV, Min A, Min L o Min FLC se extrajeron utilizando un kit de extracción de ARN viral (Qiagen). Se utilizaron cuatro microlitros de la extracción de ARN de 60 μ l en una reacción de RT utilizando transcriptasa inversa superscript III y un cebador marcado que contenía una cola 3' específica del RSV complementaria al ARN genómico del RSV, y una secuencia etiquetada en 5' no relacionada. A continuación, el 10 % de cada reacción de ADNc (correspondiente a $2,7 \times 10^4$ ufp) se utilizó en la qPCR específica del genoma descrita anteriormente. Los resultados de la cuantificación del ARN genómico se expresan como diferencia de pliegues en comparación con el rRSV.

40 **Figura 2: Replicación de ciclo único de los CPD rRSV en comparación con rRSV en células Vero.** Los pocillos duplicados de cultivos monocapa confluentes de células Vero en placas de 6 pocillos se infectaron de forma simulada o a una MOI de 1 con rRSV, Min A, Min L y Min FLC y se incubaron a 32 o 37°C. Los cultivos se lavaron una vez tras 2 h de adsorción. Los cultivos se lavaron una vez después de 2 horas de adsorción. Cada cuatro horas (de 4 a 24 h pi), se recogieron los virus de un pocillo y se congelaron para la valoración de virus. Se cosecharon células de un pocillo de réplica para analizar la síntesis de ARN y proteínas. El ARN asociado a las células se utilizó para dirigir y cuantificar específicamente (A) los antígenicos/ARNm del virus o (D) el ARN genómico del RSV mediante una qPCR específica de la cadena (Bessaud, M., et al., 2008. J Virol Methods 153:182-189). Los resultados de la qPCR se analizaron mediante el procedimiento del ciclo umbral comparativo (Δ Ct), se normalizaron con respecto al 18S ARNr y, a continuación, para cada virus, se expresaron como aumento del pliegue con respecto al punto temporal de 4 horas. (B, C) Diez microgramos de lisados celulares se separaron en geles NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a membranas PVDF-F. Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo Odyssey® y se incubaron con pAb específico del RSV de conejo y α -tubulina de ratón utilizada como

control de carga. Tras el lavado, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios IgG de cabra anti-conejo IRDye 800 e IgG de cabra anti-ratón IRDye 680. Las tiras de membrana se escanearon en el sistema Odyssey® Infrared Imaging System, se corrigió el fondo y se evaluó la intensidad de fluorescencia de la proteína N utilizando el software Odyssey®, versión 3.0 (Li-Cor). El punto temporal de 20 horas se muestra en (D). (E) Los títulos virales de 4 a 24 hpi se expresan en \log_{10} ufp/ml. Las alícuotas de virus se valoraron por duplicado a la temperatura permisiva de 32 °C. Para cada punto temporal, se muestra el valor medio del duplicado.

Figura 3: Replicación reducida de los CPD rRSV en ratones Balb/c. Ratones Balb/c de seis semanas de edad fueron inoculados por vía intranasal en grupos de diez con $4,5 \times 10^5$ ufp de rRSV, Min A, Min L o Min FLC. A los días 4 y 5, se sacrificaron cinco ratones por grupo. Los cornetes nasales (TN) y el tejido pulmonar se recogieron y homogeneizaron por separado. Los títulos del virus se determinaron por duplicado mediante ensayo de placas en células Vero incubadas a 32°C y se expresaron como \log_{10} ufp/gr. Se muestra el valor mediano. La significancia de los conjuntos de datos se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunns. Los datos sólo se consideraron significativos a $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$ en comparación con rRSV).

Figura 4: Reducción de la replicación de los CPD rRSV en monos verdes africanos (AGM). Se inocularon AGM en grupos de cuatro por vía intranasal e intratraqueal con 1×10^6 ufp de Min A, Min L, Min FLC o rRSV por AGM. Se recogieron frotis nasofaríngeos (NP) todos los días de 0 a 12 días después de la inoculación y muestras de lavado traqueal (NP) en días alternos de 0 a 12 días. Los títulos del virus en NP y TL se determinaron por duplicado en células Vero incubadas a 32°C como se ha descrito anteriormente. Se recogieron sueros los días 0 y 28 y se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes con reducción de placa del 60 % (PRNT₆₀) en un ensayo de neutralización con reducción de placa en células Vero utilizando rRSV que expresaba GFP. La significancia de los conjuntos de datos se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunns. Los datos sólo se consideraron significativos a $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ en comparación con rRSV).

Figura 5: Crecimiento de Min L y Min FLC a temperaturas restrictivas crecientes. Diez cultivos replicados de Min L (A) y Min FLC (B) se cultivaron en serie a una temperatura restrictiva creciente empezando por la temperatura de desconexión (37 y 35°C para Min L y Min FLC, respectivamente) con una MOI de entrada de 0,1 ufp/célula hasta que se observó una citopatología máxima (entre el día 7 y el 14). Se realizaron dos pasajes para una temperatura dada antes de aumentarla en 1°C. Paralelamente, como control, se cultivaron muestras duplicadas de ambos virus en células Vero de la misma forma, pero a 32°C únicamente (temperatura no restrictiva). Para cada pasaje, se utilizó 1 ml (de 5 ml) del sobrenadante para inocular el siguiente pasaje. Para cada pasaje, se congelaron alícuotas para la valoración y el análisis de secuencias. El título del virus se determinó por duplicado mediante un ensayo de placas en células Vero a la temperatura permisiva (32°C). El pasaje número 0 representa el virus de entrada. (C) Los electroferogramas muestran la secuencia de nucleótidos de tres mutaciones que se detectaron en N (aa 136), P (aa 114) y M2-1 (aa 88) de una réplica de Min L (triángulo relleno gris en (A)) que presentaba sincitios extensos a 39 y 40°C.

Figura 6: Generación de rRSV sintéticos desoptimizados en pares de codones derivados del virus Min L y caracterización de su crecimiento en células Vero. (A) Se generó un rRSV quimérico sintético de par de codones desoptimizado (CPD) (Min L) basado en la columna vertebral del RSV wt (número de acceso Genbank M74568). Min L contenía un CPD ORF de la proteína polimerasa L. Las secuencias codificantes CPD polimerasa y wt están representadas por un recuadro sombreado en negro o gris, respectivamente. Se indican los nombres de los genes, así como los sitios de restricción enzimática utilizados para la generación del ADNc sintético quimérico. Las mutaciones identificadas en N (aa 136), P (aa 114) y M2-1 (aa 88, cf. Figura 1) se introdujeron en todas las combinaciones posibles. (B) Cinética de crecimiento multiciclo en células Vero a 32 y 37°C. Cultivos monocapa confluentes de células Vero en placas de 6 pocillos se infectaron por duplicado con rRSV, Min L o Min L que contenían las mutaciones de interés en todas las combinaciones posibles con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 y se incubaron a 32 o 37°C. Los virus se cosecharon diariamente desde el día 1 al 14 raspando las células infectadas en el medio seguido de vórtex, clarificación del sobrenadante por centrifugación y congelación de las alícuotas de virus. Cada alícuota se valoró por duplicado a la temperatura permisiva de 32°C. Para cada punto temporal, se muestra el valor medio del duplicado y la desviación estándar. (C) Fenotipo del tamaño de la placa en células Vero a 32°C de rRSV y los CPD rRSVs.

La Figura 7 muestra un alineamiento de las secuencias genómicas del RSV wt (SEQ ID NO: 1), RSV Min A (SEQ ID NO: 2), RSV Min B (SEQ ID NO: 3), RSV Min L (SEQ ID NO: 4), y RSV FLC (SEQ ID NO: 5).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. En la medida en que la divulgación técnica que sigue contiene enseñanzas que van más allá del alcance de las reivindicaciones, dichas enseñanzas se proporcionan a título informativo.

En el presente documento se proporcionan RSV recombinantes adecuados para el uso de vacunas en seres humanos. Los RSV atenuados descritos en el presente documento se producen introduciendo cambios de codones en el genoma viral que no son procesados de forma óptima por la célula huésped. La mayoría de estas mutaciones no causarán un cambio en el aminoácido resultante de las proteínas codificadas por el genoma viral, permitiendo así la producción de

virus que tienen las mismas características antigénicas que los virus de tipo silvestre. Sin embargo, debe entenderse que los cambios no codificantes generalizados en los codones del genoma viral pueden dar lugar a una presión selectiva que dé lugar a una o más mutaciones de aminoácidos en los virus descritos en el presente documento. Además, los virus descritos pueden combinarse con mutaciones atenuantes conocidas del RSV o de virus relacionados para obtener un virus atenuado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sensible a la temperatura" se refiere a la propiedad de replicación reducida en comparación con el virus de tipo silvestre a temperaturas a las que el virus de tipo silvestre se replica normalmente. Por ejemplo, el RSV de tipo silvestre se replica eficientemente dentro del rango de 32°C a 40°C, mientras que un mutante sensible a la temperatura vería restringida su replicación a las temperaturas más altas dentro de este intervalo, pero podría propagarse eficientemente a 32°C, lo que se denomina "temperatura permisiva". Estos virus pueden fabricarse mediante procedimientos recombinantes útiles para identificar cepas atenuadas del RSV. Una vez identificadas, las mutaciones atenuantes pueden introducirse en cepas derivadas biológicamente, utilizarse para atenuar o estabilizar aún más las cepas atenuadas del RSV existentes, o pueden diseñarse cepas atenuadas del RSV *de novo*.

El término "de tipo silvestre", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fenotipo viral que es consistente con la replicación eficiente en un huésped humano permisivo adecuado, y que puede inducir la enfermedad en un huésped humano susceptible (por ejemplo, un lactante no infectado por el RSV). La cepa prototipo A2, representada por el número de acceso M74568 del Genbank, pero no limitada estrictamente a esa secuencia, se considera un ejemplo de cepa de tipo silvestre. Los virus derivados que contienen mutaciones que se supone que no reducen significativamente la replicación o la enfermedad in vivo también tienen el fenotipo "silvestre". Por el contrario, los derivados virales que muestran reducciones en la replicación de aproximadamente 10 veces, 100 veces o más in vivo pueden considerarse "restringidos". Por lo general, la replicación restringida in vivo en un huésped susceptible se asocia a una reducción de la enfermedad, o "atenuación". Así, la infección de un huésped susceptible con un virus "atenuado" provoca una reducción de la enfermedad en ese huésped, en comparación con una cepa de tipo silvestre.

El término "progenitor" utilizado en el contexto de un virus, proteína o polinucleótido denota el virus, proteína o polinucleótido del que deriva otro virus. El virus derivado puede fabricarse por medios recombinantes o cultivando el virus parental en condiciones que den lugar a una mutación y, por tanto, a un virus diferente. El término puede referirse a genomas virales y secuencias codificadoras de proteínas a partir de los cuales se derivan nuevas secuencias, que pueden estar más o menos atenuadas. Los virus y secuencias parentales suelen ser de tipo silvestre o prototipos naturales o aislados de variantes para los que se desea obtener un virus más atenuado. Sin embargo, los virus parentales también incluyen mutantes creados o seleccionados específicamente en el laboratorio sobre la base de propiedades deseables reales o percibidas. En consecuencia, los virus parentales candidatos para la atenuación incluyen mutantes de virus de tipo silvestre o de origen natural que tienen delecciones, inserciones, sustituciones de aminoácidos y similares, y también incluyen mutantes que tienen sustituciones de codones.

El término "gen" o "secuencia génica" se refiere a una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína e incluye únicamente la porción de marco de lectura abierto de dicha secuencia polinucleotídica.

Secuencias de proteínas del RSV codificadas por polinucleótidos desoptimizados en codones

En el presente documento se describen secuencias polinucleotídicas de RSV que hacen uso de múltiples codones que contienen sustituciones nucleotídicas silenciosas diseñadas en múltiples ubicaciones del genoma, en las que las sustituciones introducen numerosos codones sinónimos en el genoma. Esta sustitución de codones sinónimos altera diversos parámetros, incluyendo el sesgo de codones, el sesgo de pares de codones, la densidad de codones desoptimizados y pares de codones desoptimizados, la estructura secundaria del ARN, el contenido de dinucleótidos CpG, el contenido de C+G, los sitios de cambio de marco de traducción, los sitios de pausa de traducción, la presencia o ausencia de secuencias de reconocimiento de microARN específicas de tejido, o cualquier combinación de las mismas, en el genoma. Debido al gran número de defectos implicados, el virus atenuado de la invención proporciona un medio para producir vacunas vivas atenuadas de forma estable contra el RSV.

En el presente documento se describe un virus atenuado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína viral o una porción de la misma que es idéntica a la secuencia correspondiente de un virus parental, en el que la secuencia de nucleótidos del virus atenuado contiene los codones de una secuencia parental de la que deriva, y en el que la secuencia de nucleótidos es menos del 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos del virus parental. La secuencia de nucleótidos puede ser menos del 80 % idéntica a la secuencia del virus parental. La secuencia de nucleótidos puede ser menos del 70 % idéntica a la secuencia del virus parental. La secuencia de nucleótidos sustituida que proporciona la atenuación tiene al menos 100 nucleótidos de longitud, o al menos 250 nucleótidos de longitud, o al menos 500 nucleótidos de longitud, o al menos 1000 nucleótidos de longitud. El sesgo del par de codones de la secuencia atenuada es menor que el sesgo del par de codones del virus parental, y se reduce en al menos aproximadamente 0.05, o al menos aproximadamente 0.1, o al menos aproximadamente 0.2.

En el presente documento se describen polinucleótidos recombinantes desoptimizados por pares de codones que codifican una secuencia de aminoácidos del virus respiratorio sincitial (RSV) de un RSV parental, donde la secuencia

de nucleótidos difiere de la secuencia de nucleótidos correspondiente del virus parental, lo que da como resultado una identidad de nucleótidos de aproximadamente 77 % a aproximadamente 93 %. La secuencia de aminoácidos del RSV parental puede tener una mutación atenuante existente, de tal forma que el polinucleótido recombinante resultante codificará la mutación atenuante que se desea codificar. Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar cualquiera de las proteínas NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F o L del RSV, o una combinación de estas proteínas.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína NS1 del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NS1 del RSV es de aproximadamente 75 % a aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NS1 del RSV es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NS1 del RSV es aproximadamente 87 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 99 a 518 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína NS2 del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NS2 del RSV es de aproximadamente 75 % a aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NS2 del RSV es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NS2 del RSV es aproximadamente 88 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 628 a 1002 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína N del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína N del RSV es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína N del RSV es de aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína N del RSV es aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 1141 a 2316 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína P del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína P del RSV es aproximadamente 75 % a aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína P del RSV es aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína P del RSV es aproximadamente 84 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 2347 a 3072 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína M del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína M del RSV es aproximadamente 75 % a aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína M del RSV es aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína M del RSV es aproximadamente 83 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 3262 a 4032 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína SH del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína SH del RSV es de aproximadamente 85 % a aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína SH del RSV es aproximadamente 92 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 4304 a 4498 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína G del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína G del RSV es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína G del RSV es de aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína G del RSV es aproximadamente 78 % idéntica a la

secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 4577 a 5473 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

5 Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento pueden codificar la proteína F del RSV. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F del RSV es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F del RSV es de aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F del RSV es aproximadamente 77 % idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente de un virus parental. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 5550 a 7274 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

10 Los polinucleótidos recombinantes de la invención codifican la proteína L del RSV. En una realización, el polinucleótido recombinante tiene la secuencia de nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 5. El virus parental es un virus RSV del subgrupo A.

15 Las secuencias polinucleotídicas de RSV desoptimizadas descritas en el presente documento pueden utilizarse en combinación unas con otras para formar polinucleótidos con dos o más secuencias génicas desoptimizadas. El polinucleótido descrito puede incluir cualesquiera dos polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifiquen proteínas RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, y L. El polinucleótido descrito puede incluir cualesquiera tres polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifiquen proteínas RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, y L. El polinucleótido descrito puede incluir cuatro polinucleótidos recombinantes desoptimizados de codón cualesquiera que codifiquen proteínas del RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, y L. El polinucleótido descrito puede incluir cualesquiera cinco polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifiquen proteínas RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F y L. El polinucleótido descrito puede incluir cualesquiera seis polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifiquen proteínas del RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, y L. El polinucleótido descrito puede incluir cualesquiera siete polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifican proteínas RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F y L. El polinucleótido descrito puede incluir cualesquiera ocho polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifiquen proteínas RSV seleccionadas de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, y L. En algunas realizaciones, el polinucleótido descrito puede incluir nueve polinucleótidos recombinantes desoptimizados en codón que codifican proteínas RSV: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F y L. Estos polinucleótidos descritos pueden ser un genoma RSV que tenga una o más secuencias genéticas RSV desoptimizadas en codones; o un antigenoma correspondiente que comprenda un polinucleótido complementario a los polinucleótidos descritos. Los virus RSV Min A, RSV Min B, RSV Min L y RSV Min FLC tienen secuencias genómicas representativas de dichos constructos virales; sin embargo, podrían producirse otros virus y genomas virales o antigenomas correspondientes utilizando las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento.

20 Las secuencias de codones desoptimizadas proporcionadas en el presente documento también pueden incorporar mutaciones en la secuencia de aminoácidos que se derivan de la secuencia del gen parental, que se sabe que existen para el gen o la proteína codificada por el gen, o que se producen en el gen desoptimizado de novo durante el ciclo de vida de un virus que tiene el gen desoptimizado. En algunas realizaciones, la mutación puede ser una mutación codificante, dando lugar a un residuo de aminoácido diferente en una proteína determinada. En otras realizaciones, la mutación puede ocurrir en un gen que tenga una secuencia no modificada, o parental. Por ejemplo, en una realización, la mutación puede producirse en el codón que codifica el residuo de aminoácido 136 de la proteína N. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 136 de la proteína N puede hacer que se codifique un aminoácido distinto de la lisina en la posición 136 de la proteína N. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 136 de la proteína N que hace que se codifique un aminoácido distinto de la lisina en la posición 136 de la proteína N puede ocurrir en un virus que tiene una proteína L desoptimizada por codón, tal como RSV Min L. En una realización, el aminoácido distinto de la lisina codificado en la posición 136 de la proteína N puede ser arginina. En una realización, la mutación puede producirse en el codón que codifica el residuo de aminoácido 114 de la proteína P. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 114 de la proteína P puede hacer que se codifique un aminoácido distinto del ácido glutámico en la posición 114 de la proteína P. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 114 de la proteína P que hace que se codifique un aminoácido distinto del ácido glutámico en la posición 114 de la proteína P puede ocurrir en un virus que tiene una proteína L desoptimizada por codón, tal como RSV Min L. En una realización, el aminoácido distinto del ácido glutámico codificado en la posición 114 de la proteína P puede ser valina. En una realización, la mutación puede ocurrir en el codón que codifica el residuo de aminoácido 88 de la proteína M2-1. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 88 de la proteína M2-1 puede hacer que se codifique un aminoácido distinto de la asparagina en la posición 88 de la proteína M2-1. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 88 de la proteína M2-1 que hace que se codifique un aminoácido distinto de la asparagina en la posición 88 de la proteína M2-1 puede ocurrir en un virus que tiene una proteína L desoptimizada por codón, tal como RSV Min L. En una realización, el aminoácido distinto de la asparagina codificado en la posición 88 de la proteína M2-1 puede ser lisina. En una realización, la mutación puede ocurrir en el codón que codifica el residuo de aminoácido 73 de la proteína M2-1. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 73 de la proteína M2-1 puede hacer que se codifique un aminoácido distinto de la alanina en la posición

73 de la proteína M2-1. En una realización, la mutación en el codón que codifica el residuo de aminoácido 73 de la proteína M2-1 que hace que se codifique un aminoácido distinto de la alanina en la posición 73 de la proteína M2-1 puede ocurrir en un virus que tiene una proteína L desoptimizada por codón, tal como RSV Min L. En una realización, el aminoácido distinto de la alanina codificado en la posición 73 de la proteína M2-1 puede ser serina.

5 Procedimientos de producción de RSV recombinantes

La capacidad de producir RSV infeccioso a partir de ADNc permite la introducción de cambios de ingeniería específicos, incluyendo mutaciones atenuantes específicas del sitio, delección de genes, delección o modificación de la secuencia de inicio de genes, y un amplio espectro de otros cambios recombinantes, en el genoma de un virus recombinante para producir un virus atenuado y cepas vacunales de RSV eficaces. Tales cambios de modificación pueden, o no, basarse en mutaciones biológicas identificadas en otras cepas de virus.

En el presente documento se describen RSV infecciosos producidos por procedimientos recombinantes, por ejemplo, a partir de ADNc. En una realización, el RSV infeccioso se produce mediante la coexpresión intracelular de un ADNc que codifica el ARN genómico del RSV, junto con aquellas proteínas virales necesarias para generar una nucleocápside transcriptora y replicante, tal como una o más secuencias que codifican la proteína principal de la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P) de la nucleocápside, la proteína polimerasa grande (L) y una proteína M2-1 del factor de elongación transcripcional. Los plásmidos que codifican otras RSV, tal como la proteína no estructural 1 (NS1), la proteína no estructural 2 (NS2), la proteína de la matriz (M), la proteína hidrófoba pequeña (SH), la glicoproteína (G), la proteína de fusión (F) y la proteína M2-2, también pueden incluirse con estas proteínas esenciales. En consecuencia, también se describen en el presente documento polinucleótidos aislados que codifican los virus mutados descritos, componen los genomas descritos o los antigenomas correspondientes, expresan los genomas descritos o los antigenomas correspondientes, o codifican diversas proteínas útiles para fabricar RSV recombinantes *in vitro*. Estos polinucleótidos pueden incluirse o expresarse mediante vectores para producir un RSV recombinante. En consecuencia, también se ejemplifican en el presente documento las células transfectadas con los polinucleótidos o vectores aislados. Además, también se divulgan varios procedimientos relacionados con los RSV descritos. Por ejemplo, se describen procedimientos de producción de los RSV recombinantes descritos en el presente documento, así como procedimientos de producción de una respuesta inmunitaria a una proteína vírica en un animal, mamífero o ser humano.

La invención en el sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones y permite la incorporación de mutaciones biológicamente derivadas, junto con una amplia gama de otros cambios deseados, en cepas vacunales recombinantes de RSV. Por ejemplo, la capacidad de producir virus a partir de ADNc permite la incorporación de mutaciones que se producen en las vacunas candidatas atenuadas contra el RSV que se introducen, individualmente o en diversas combinaciones seleccionadas, en un clon de ADNc de longitud completa, y determinar fácilmente los fenotipos de los virus recombinantes rescatados que contienen las mutaciones introducidas. Los cambios de aminoácidos identificados en virus atenuados, derivados biológicamente, por ejemplo, en un RSV pasivado en frío (cpRSV), o en una cepa atenuada derivada del mismo, tal como un derivado sensible a la temperatura del cpRSV (cptsRSV), pueden incorporarse dentro de clones de RSV recombinantes. Estos cambios a partir de una secuencia RSV de tipo silvestre o mutante derivada biológicamente especifican las características deseadas en los clones resultantes, por ejemplo, un fenotipo atenuado o más atenuado en comparación con un fenotipo RSV parental de tipo silvestre o atenuado de forma incompleta. A este respecto, se divulgan en el presente documento nuevas mutaciones del RSV que pueden combinarse, individualmente o entre sí, con cepas atenuadas preexistentes del RSV para producir virus con las características deseadas, tal como una mayor atenuación o una mayor estabilidad genética (y por tanto fenotípica) *in vitro* e *in vivo*.

Además de las mutaciones puntuales únicas y múltiples y de las mutaciones específicas de sitio, los cambios en el RSV recombinante divulgados en el presente documento incluyen delecciones, inserciones, sustituciones o reordenamientos de genes enteros o segmentos de genes. Estas mutaciones pueden afectar a pequeños números de bases (por ejemplo, de 15-30 bases, hasta 35-50 bases o más), o a grandes bloques de nucleótidos (por ejemplo, 50-100, 100-300, 300-500, 500-1.000 bases) dependiendo de la naturaleza del cambio (es decir, se puede cambiar un pequeño número de bases para insertar o eliminar un epítipo inmunogénico o cambiar un pequeño segmento genético o suprimir uno o más codones con fines de atenuación, mientras que cuando se añaden, sustituyen, suprimen o reordenan genes o grandes segmentos genéticos, intervienen grandes bloques de bases. Estas alteraciones serán comprendidas por los expertos en la técnica basándose en trabajos previos realizados con el RSV o virus relacionados. Los virus con mutaciones en bloque de este tipo también pueden combinarse con las nuevas mutaciones del RSV descritas en el presente documento, ya sea individualmente o en combinación con otras, para producir virus con las características deseadas, tal como una mayor atenuación o una mayor estabilidad genética (y por lo tanto fenotípica) *in vitro* e *in vivo*.

En aspectos adicionales, se describe la complementación de mutaciones adoptadas a partir de RSV biológicamente derivados, por ejemplo, mutaciones cp y ts, muchas de las cuales ocurren en el gen L, con tipos adicionales de mutaciones que implican los mismos o diferentes genes o señales de ARN en un clon de RSV recombinante. El RSV codifica diez ARNm y once proteínas. Tres de ellas son proteínas transmembrana de superficie, es decir, la proteína G de fijación, la proteína F de fusión implicada en la penetración y la pequeña proteína hidrófoba SH. Aunque pueden

5 asignarse funciones específicas a proteínas concretas, se reconoce que estas asignaciones son provisionales y descriptivas. G y F son los principales antígenos protectores y de neutralización viral. Otras cuatro proteínas están asociadas a la nucleocápside vírica, es decir, la proteína N de unión al ARN, la fosfoproteína P, la proteína L de la gran polimerasa y el factor M2-1 de elongación de la transcripción. La proteína matriz M forma parte del virión interno y probablemente media en la asociación entre la nucleocápside y la envoltura. Por último, existen dos proteínas no
10 estructurales, NS1 y NS2, de función desconocida. Estas proteínas pueden alterarse selectivamente en cuanto a su nivel de expresión, o pueden añadirse, suprimirse, sustituirse o reordenarse, total o parcialmente, solas o en combinación con otras modificaciones deseadas, en un RSV recombinante para obtener nuevos clones infecciosos de RSV. Además, el genoma del ARN contiene señales de acción cis, que incluyen, pero no se limitan a, las regiones líder y remolque, así como las señales de inicio de gen (GS) y fin de gen (GE) de transcripción que bordean cada gen. Estas señales ayudan a controlar la encapsidación, la transcripción y la replicación, y también pueden tener otras funciones. Estas señales pueden alterarse selectivamente para obtener nuevos clones de RSV.

15 En el presente documento también se describen procedimientos para producir un RSV infeccioso a partir de uno o más polinucleótidos aislados, por ejemplo, uno o más ADNc. En consecuencia, el ADNc que codifica un genoma o antígenoma del RSV se construye para la coexpresión intracelular o *in vitro* con las proteínas víricas necesarias para formar el RSV infeccioso. Por "antígenoma del RSV" se entiende una molécula polinucleotídica de sentido positivo aislada que sirve de molde para la síntesis del genoma progenie del RSV. Preferentemente, se construye un ADNc que es una versión de sentido positivo del genoma del RSV, correspondiente al ARN intermedio replicativo, o
20 antígenoma, para minimizar la posibilidad de hibridación con transcritos de sentido positivo de las secuencias complementarias que codifican proteínas necesarias para generar una nucleocápside transcriptora y replicante, es decir, secuencias que codifican las proteínas N, P, L y M2-1.

25 Un genoma nativo del RSV comprende típicamente una molécula polinucleotídica de sentido negativo que, a través de los ARNm virales complementarios, codifica once especies de proteínas virales, es decir, las proteínas no estructurales NS1 y NS2, N, P, matriz (M), hidrófoba pequeña (SH), glicoproteína (G), fusión (F), M2-1, M2-2, 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., *Virology* 208:478-484 (1995). El genoma o antígenoma correspondiente del RSV recombinante sólo tiene que contener los genes o porciones de los mismos necesarios para que las partículas virales o subvirales
30 codificadas sean infecciosas. Además, los genes o porciones de los mismos pueden ser proporcionados por más de una molécula de polinucleótidos, es decir, un gen puede ser proporcionado por complementación o similares a partir de una molécula de nucleótidos separada.

35 Por RSV recombinante se entiende una partícula viral o subviral de RSV o similar a RSV derivada directa o indirectamente de un sistema de expresión recombinante o propagada a partir de virus o partículas subvirales producidas a partir de los mismos. El sistema de expresión recombinante empleará un vector de expresión recombinante que comprenda una unidad transcripcional enlazada operablemente que comprenda un ensamblaje de al menos un elemento o elementos genéticos que tengan un papel regulador en la expresión del gen RSV, por ejemplo, un promotor, una secuencia estructural o codificante que se transcriba en ARN de RSV, y secuencias apropiadas de
40 iniciación y terminación de la transcripción.

45 Para producir RSV infeccioso a partir del genoma expresado con ADNc, el genoma se coexpresa con las proteínas del RSV necesarias para (i) producir una nucleocápside capaz de replicar el ARN, y (ii) hacer que las nucleocápsides progenitoras sean competentes tanto para la replicación como para la transcripción del ARN. La transcripción por la nucleocápside del genoma proporciona las demás proteínas del RSV e inicia una infección productiva. Las proteínas adicionales del RSV necesarias para una infección productiva también pueden suministrarse mediante coexpresión.

50 Medios alternativos para construir ADNc que codifique el genoma o el antígenoma correspondiente se incluyen mediante transcripción-PCR inversa utilizando 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 ADNc de subunidades a tan sólo una o dos piezas. Pueden utilizarse diferentes promotores (por ejemplo, T3, SP6) o diferentes ribozimas (por ejemplo, la del virus de la hepatitis delta). Se pueden utilizar diferentes vectores de ADN (por ejemplo, cósmidos) para la propagación con el fin de acomodar mejor el genoma de gran tamaño o el antígenoma correspondiente.

55 Las proteínas N, P, L y M2-1 están codificadas por uno o más vectores de expresión que pueden ser el mismo o distinto del que codifica el genoma, y diversas combinaciones de los mismos. Pueden incluirse proteínas adicionales según se desee, codificadas por su propio vector o por un vector que codifique una proteína N, P, L o M2-1 o el genoma completo. La expresión del genoma y de las proteínas a partir de plásmidos transfectados puede conseguirse, por ejemplo, haciendo que cada ADNc esté bajo el control de un promotor para la ARN polimerasa T7, que a su vez se suministra mediante infección, transfección o transducción con un sistema de expresión para la ARN polimerasa T7, por ejemplo, un recombinante de la cepa MVA del virus vaccinia que expresa la ARN polimerasa T7 (Wyatt et al., *Virology*, 210:202-205 (1995)). Las proteínas virales, y/o la ARN polimerasa T7, también pueden obtenerse a partir de células de mamífero transformadas, o por transfección de ARNm o proteínas preformadas.

65 Para producir virus recombinantes que tengan un genoma desoptimizado en codones con las secuencias proteicas

5 descritas en el presente documento, se pueden utilizar plásmidos que codifiquen un genoma de RSV que tenga una o más secuencias genéticas sustituidas por la correspondiente secuencia desoptimizada en codones proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, los genomas RSV codificados por cualquiera de los SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5 pueden utilizarse de esta manera. Los constructos pRSV_Min A, pRSV_Min B, pRSV_Min L, pRSV_Min FLC, pRSV_Min L_N, pRSV_Min L_p, pRSV_Min L_M21, pRSV_Min L_NP, pRSV_Min L_NM21, pRSV_Min L_PM21, o pRSV_Min L_NPM21 proporcionan ejemplos a este respecto.

10 Alternativamente, la síntesis del antígenoma o genoma puede realizarse *in vitro* (libre de células) en una reacción combinada de transcripción-traducción, seguida de transfección en células. O bien, el ARN del antígenoma o del genoma puede sintetizarse *in vitro* y transfectarse en células que expresen proteínas del RSV.

Usos de los genes y virus RSV de codón desoptimizado

15 Para seleccionar los virus candidatos a vacunas de entre las cepas recombinantes de RSV capaces de producirse utilizando las secuencias polinucleotídicas desoptimizadas por codones que se proporcionan en el presente documento, se determinan los criterios de viabilidad, replicación eficiente *in vitro*, atenuación *in vivo*, inmunogenicidad y estabilidad fenotípica de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los virus más deseados para las vacunas deben mantener la viabilidad, replicarse suficientemente *in vitro* en condiciones permisivas para posibilitar la fabricación de la vacuna, tener un fenotipo de atenuación estable, replicarse en un huésped inmunizado (aunque a niveles más bajos) y provocar eficazmente la producción de una respuesta inmunitaria en una vacuna suficiente para conferir protección contra la enfermedad grave causada por una infección posterior por el virus de tipo silvestre. Evidentemente, los mutantes del RSV conocidos hasta ahora no cumplen todos estos criterios. De hecho, contrariamente a las expectativas basadas en los resultados comunicados para el RSV atenuado conocido, los virus descritos en el presente documento sólo son viables y más atenuados que los mutantes anteriores, sino que son más estables genéticamente *in vivo* que los mutantes estudiados previamente.

20 Para propagar un virus RSV para uso en vacunas y otros fines, pueden utilizarse varias líneas celulares que permiten el crecimiento del RSV. El RSV crece en diversas células humanas y animales. Las líneas celulares preferidas para propagar el RSV atenuado para uso en vacunas incluyen las células DBS-FRHL-2, MRC-5 y Vero. Los mayores rendimientos de virus se consiguen normalmente con líneas celulares epiteliales tal como las células Vero. Las células se inoculan típicamente con virus a una multiplicidad de infección que oscila de aproximadamente 0,001 y 1,0, o más, y se cultivan en condiciones permisivas para la replicación del virus, por ejemplo, a 30-37°C y durante 3-10 días, o el tiempo necesario para que el virus alcance un título adecuado. Los virus sensibles a la temperatura suelen cultivarse utilizando 32°C como "temperatura permisiva". El virus se extrae del cultivo celular y se separa de los componentes celulares, normalmente mediante procedimientos de clarificación bien conocidos, por ejemplo, centrifugación, y puede purificarse aún más si se desea mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 El RSV que se ha atenuado como se describe en el presente documento puede probarse en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos y generalmente aceptados para confirmar la atenuación adecuada, la resistencia a la reversión fenotípica y la inmunogenicidad para el uso de la vacuna. En los ensayos *in vitro*, el virus modificado, que puede ser un RSV atenuado, derivado biológicamente o recombinante, se somete a pruebas de sensibilidad a la temperatura de replicación del virus o "fenotipo ts", y de fenotipo de placa pequeña. Los virus modificados se siguen probando en modelos animales de infección por RSV. Se han descrito diversos modelos animales (por ejemplo, murino, rata de algodón y primate) que son conocidos por los expertos en la técnica.

45 El virus atenuado que es un componente de una vacuna está en una forma aislada y típicamente purificada. Por aislado se entiende el RSV que se encuentra en un entorno distinto al nativo de un virus de tipo silvestre, tal como la nasofaringe de un individuo infectado. En términos más generales, se entiende por aislado el virus atenuado como componente de un cultivo celular u otro medio artificial. Por ejemplo, el RSV atenuado de la invención puede producirse mediante un cultivo celular infectado, separarse del cultivo celular y añadirse a un estabilizador que contenga otros RSV no naturales.

50 Las vacunas contra el RSV contienen como ingrediente activo una cantidad inmunogénicamente eficaz de RSV producido como se describe en el presente documento. El RSV derivado biológicamente o recombinante puede utilizarse directamente en formulaciones vacunales. El virus biológicamente derivado o recombinantemente modificado puede introducirse en un huésped con un portador y/o adyuvante fisiológicamente aceptable. Los portadores 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 envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de su administración, como se ha mencionado anteriormente. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, que incluyen, pero no se limitan a, agentes reguladores y tamponadores del pH, agentes reguladores de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, sacarosa, sulfato de magnesio, tampones de fosfato, tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), monolaurato de sorbitán y oleato de trietanolamina. Entre los adyuvantes aceptables se encuentran el adyuvante incompleto de Freund, el fosfato de aluminio, el hidróxido de aluminio o el alumbre, que son materiales bien conocidos en la técnica.

Entre los adyuvantes preferidos también se encuentran Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, Mass.), MPL™ (lípidio monofosforilo A 3-0-deacilado; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.), e interleucina-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.).

5 Tras la inmunización con una composición de vacuna contra el RSV como la descrita en el presente documento, mediante inyección, aerosol, gotitas, vía oral, tópica u otra vía, el sistema inmunitario del huésped responde a la vacuna produciendo anticuerpos específicos para las proteínas del virus RSV, por ejemplo, las glicoproteínas F y G. Como resultado de la vacunación, el huésped se vuelve al menos parcial o completamente inmune a la infección por RSV, o resistente al desarrollo de enfermedad moderada o grave por RSV, en particular del tracto respiratorio inferior.

10 El huésped al que se administra la vacuna puede ser cualquier mamífero susceptible a la infección por el RSV o un virus estrechamente relacionado y capaz de generar una respuesta inmunitaria protectora a los antígenos de la cepa vacunadora. Así, entre los huéspedes adecuados se incluyen los seres humanos, primates no humanos, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, lagomorfos, roedores, tales como ratones o ratas alodoneras, etc. En consecuencia, en el presente documento se describen procedimientos para crear vacunas para diversos usos humanos y veterinarios.

Las composiciones vacunales que contienen el RSV atenuado se administran a un sujeto susceptible o en riesgo de infección por RSV en una "dosis inmunogénicamente eficaz" que sea suficiente para inducir o mejorar las capacidades de respuesta inmunitaria del individuo contra el RSV. La composición de la vacuna contra el RSV puede administrarse a un sujeto mediante inyección, aerosol, pulverización nasal, gotitas nasales, inoculación oral o aplicación tópica. En el caso de sujetos humanos, el virus atenuado se administra de acuerdo con protocolos bien establecidos de vacunas humanas contra el RSV (Karron et al JID 191:1093-104, 2005). Brevemente, los adultos o los niños se inoculan por vía intranasal a través de gotas con una dosis inmunogénicamente eficaz de vacuna RSV, normalmente en un volumen de 0,5 ml de un diluyente o portador fisiológicamente aceptable. Esto tiene la ventaja de la simplicidad y la seguridad en comparación con la inmunización parenteral con una vacuna no replicante. También proporciona una estimulación directa de la inmunidad local de las vías respiratorias, que desempeña un papel importante en la resistencia al RSV. Además, este modo de vacunación evita eficazmente los efectos inmunosupresores de los anticuerpos séricos específicos del RSV derivados de la madre, que suelen encontrarse en los más pequeños. Además, aunque la administración parenteral de antígenos del RSV puede asociarse en ocasiones a complicaciones inmunopatológicas, esto nunca se ha observado con un virus vivo.

En todos los sujetos, la cantidad precisa de vacuna RSV administrada y el momento y la repetición de la administración se determinarán por varios factores, incluyendo el estado de salud y el peso del paciente, el modo de administración, la naturaleza de la formulación, etc. Por lo general, las dosificaciones oscilarán de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 unidades formadoras de placa ("UFP") o más de virus por paciente, más comúnmente de aproximadamente 10^4 a 10^5 UFP de virus por paciente. Se podrían administrar aproximadamente 10^4 a 10^5 UFP por paciente durante la infancia, por ejemplo, entre 1 y 6 meses de edad, y una o más dosis de refuerzo adicionales entre 2 y 6 meses o más después. A los lactantes pequeños se les puede administrar una dosis de aproximadamente 10^5 a 10^6 UFP por paciente aproximadamente a los 2, 4 y 6 meses de edad, que es el momento recomendado para la administración de otras vacunas infantiles. Podría administrarse una dosis de refuerzo adicional aproximadamente a los 10-15 meses de edad. En cualquier caso, las formulaciones vacunales deben proporcionar una cantidad de RSV atenuado suficiente para estimular o inducir eficazmente una respuesta inmunitaria anti RSV (una "cantidad eficaz"). La respuesta inmunitaria resultante puede caracterizarse por diversos procedimientos. Estas incluyen la toma de muestras de lavados nasales o sueros para el análisis de anticuerpos específicos del RSV, que pueden detectarse mediante pruebas que incluyen, pero no se limitan a, la fijación del complemento, la neutralización en placa, el ensayo inmunoenzimático, el ensayo de inmunoprecipitación con luciferasa y la citometría de flujo. Además, las respuestas inmunitarias pueden detectarse mediante ensayos de citoquinas en lavados nasales o sueros, ELISPOT de células inmunitarias de cualquiera de las fuentes, RT-PCR cuantitativa o análisis de microarreglos de muestras de lavados nasales o suero, y la reestimulación de las células inmunitarias de los lavados nasales o el suero mediante la reexposición al antígeno vírico in vitro y el análisis de la producción o visualización de citoquinas, marcadores de superficie u otras medidas de correlación inmunitaria mediante citometría de flujo o la actividad citotóxica contra células objetivo indicadoras que presenten antígenos del RSV. A este respecto, también se vigila a las personas para detectar signos y síntomas de enfermedades de las vías respiratorias superiores. Al igual que con la administración a chimpancés, el virus atenuado de la vacuna crece en la nasofaringe de los vacunados a niveles aproximadamente 10 veces o más bajos que el virus de tipo silvestre, o aproximadamente 10 veces o más bajos en comparación con los niveles del RSV incompletamente atenuado.

Los neonatos y los lactantes pueden recibir múltiples dosis de la vacuna contra el RSV para obtener niveles suficientes de inmunidad. La administración puede comenzar en el primer mes de vida, y a intervalos a lo largo de la infancia, tal como a los dos meses, cuatro meses, seis meses, un año y dos años, según sea necesario para mantener niveles suficientes de protección frente a la infección natural por RSV. Los adultos que son particularmente susceptibles a la infección repetida o grave por RSV, tal como, por ejemplo, los trabajadores sanitarios, los trabajadores de guarderías, los familiares de niños pequeños, los ancianos, las personas con función cardiopulmonar comprometida, pueden recibir múltiples dosis de la vacuna contra el RSV para establecer y/o mantener respuestas inmunitarias protectoras. Los niveles de inmunidad inducida pueden controlarse midiendo las cantidades de anticuerpos séricos y secretores

neutralizantes, y dosificaciones ajustadas o vacunas repetidas según sea necesario para mantener los niveles deseados de protección. Además, distintos virus vacunales pueden estar indicados para su administración a distintos grupos de receptores. Por ejemplo, una cepa modificada del RSV que exprese una citoquina o una proteína adicional rica en epítomos de células T puede ser particularmente ventajosa para los adultos más que para los lactantes. Las vacunas pueden combinarse con virus del otro subgrupo o cepas del RSV para lograr protección contra múltiples subgrupos o cepas del RSV, o pueden diseñarse segmentos de genes seleccionados que codifican, por ejemplo, epítomos protectores de estas cepas en un clon del RSV como se describe en el presente documento.

Los diferentes virus pueden estar en mezcla y administrarse simultáneamente o estar presentes en preparaciones separadas y administrarse por separado. Por ejemplo, como las glicoproteínas F de los dos subgrupos del RSV sólo difieren en aproximadamente 11 % en la secuencia de aminoácidos, esta similitud es la base de una respuesta inmunitaria de protección cruzada, como se observa en los animales inmunizados con el RSV o el antígeno F y desafiados con una cepa heteróloga. Así, la inmunización con una cepa puede proteger contra diferentes cepas del mismo subgrupo o de subgrupos diferentes.

Las vacunas de la invención provocan la producción de una respuesta inmunitaria que puede ser protectora o reducir la magnitud de enfermedades graves de las vías respiratorias inferiores, tal como la neumonía y la bronquiolitis, cuando el individuo se infecta posteriormente con el RSV de tipo silvestre. Aunque el virus que circula de forma natural sigue siendo capaz de causar infección, sobre todo en las vías respiratorias superiores, la posibilidad de que se produzca rinitis es muy reducida como consecuencia de la vacunación y del posible refuerzo de la resistencia mediante la infección posterior por el virus de tipo silvestre. Tras la vacunación, puede haber niveles detectables de suero generado por el huésped y, en algunos casos, anticuerpos secretores capaces de neutralizar virus homólogos (del mismo subgrupo) de tipo silvestre *in vitro* e *in vivo*. En muchos casos, los anticuerpos del huésped también neutralizarán el virus de tipo silvestre de un subgrupo diferente, no vacunal.

El nivel de atenuación del virus vacunal puede determinarse, por ejemplo, cuantificando la cantidad de virus presente en el tracto respiratorio de un huésped inmunizado y comparando la cantidad con la producida por el RSV de tipo silvestre u otros RSV atenuados que se hayan evaluado como cepas vacunales candidatas. Por ejemplo, el virus atenuado tendrá un mayor grado de restricción de replicación en el tracto respiratorio superior de un huésped altamente susceptible, tal como un chimpancé, en comparación con los niveles de replicación del virus de tipo silvestre, por ejemplo, de 10 a 1000 veces menos. Para reducir aún más el desarrollo de la rinorrea, que está asociada a la replicación del virus en el tracto respiratorio superior, un virus candidato ideal para la vacuna debería mostrar un nivel restringido de replicación tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior. Sin embargo, los virus atenuados de la invención deben ser suficientemente infecciosos e inmunogénicos en humanos para conferir protección en individuos vacunados. Los procedimientos para determinar los niveles de RSV en la nasofaringe de un huésped infectado son bien conocidos en la literatura. Las muestras se obtienen por aspiración o lavado de las secreciones nasofaríngeas y el virus se cuantifica en cultivo de tejidos u otro procedimiento 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). El virus puede medirse cómodamente en la nasofaringe de animales huéspedes, tal como los chimpancés.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a título ilustrativo.

Ejemplo 1: Diseño y producción de RSV de CPD

Las secuencias de todos los marcos de lectura abiertos del RSV, excepto los que codifican las proteínas M2-1 y M2-2, se desoptimizaron por pares de codones utilizando algoritmos computacionales descritos previamente (Coleman et al., Science 320:1784-1787 (2008); Coleman et al., J Infect Dis 203:1264-1273 (2011)). Para preservar las señales putativas de acción cis y las estructuras secundarias presentes en el extremo 5' de los ARNm, se mantuvo la secuencia original de nucleótidos del RSV wt para los diez primeros codones de cada marco abierto de lectura. Se eliminaron de las secuencias CPD generadas por ordenador, mediante edición manual, los tramos de más de seis nucleótidos idénticos y las secuencias similares al final del gen RSV o al inicio del gen. El contenido de G/C y el porcentaje de nucleótidos A, G, T y C, y de dinucleótidos AT y GC, fue similar entre las secuencias WT y CPD. El porcentaje de identidad nucleotídica y el número de diferencias nucleotídicas entre los marcos de lectura abierta de WT y CPD RSV se indican en la tabla 1. Todos los cambios nucleotídicos fueron silenciosos a nivel de aminoácidos.

Tabla 1: Porcentaje de identidad nucleotídica y número de mutaciones entre los marcos abiertos de lectura (ORF) del RSV WT y CPD.

ORF	% de identidad	Número de mutaciones
NS1	87,8	65
NS2	88,1	60
N	80,0	241
P	84,4	143
M	83,0	163

(continuación)

ORF	% de identidad	Número de mutaciones
SH	92,3	23
G	78,7	197
F	77,8	422
L	79,1	1378

5 Los (r)RSV recombinantes se construyeron utilizando un sistema genético inverso basado en la cepa A2 (Collins et al., Proc Natl Acad Sci USA 92:11563-11567 (1995)). Los virus recombinantes se construyeron utilizando el ADNc del antígeno D46/6120, un derivado del plásmido ADNc rA2 con una delección de un fragmento de 112 nt de la región no codificante aguas abajo del gen SH. Este ADNc presenta una estabilidad mejorada durante el crecimiento en *E. coli*. Los cambios en la región no codificante SH no afectan a la eficacia de la replicación del virus *in vitro* o en ratones. Aunque el ADNc D46/6120 contiene esta delección, para simplificar la numeración de las posiciones de la secuencia en el presente documento se basa en la secuencia completa de la cepa A2 derivada biológicamente (número de acceso al Genbank M74568) (SEQ ID NO: 1).

15 Se generaron cuatro ADNc de longitud completa, basados en el esqueleto D46/6120. Estos cuatro ADNc se denominaron pRSV_Min A (SEQ ID NO: 2), pRSV_Min B (SEQ ID NO: 3), pRSV_Min L (SEQ ID NO: 4) y pRSV_Min FLC (SEQ ID NO: 5) (Fig. 1A). pRSV_Min A contiene los ORFs CPD de NS1, NS2, N, P, M y SH. Para construir pRSV_Min A, se transfirió un fragmento NotI-XhoI de 4508 pares de bases (pb) de ADNc sintético de RSV con estos seis ORF de CPD al ADNc D46/6120 escindido de forma similar. pRSV_Min B contiene las secuencias codificantes de CPD G y F que se transfirieron clonando un fragmento de ADNc XhoI-BamHI de 3907 pb con los ORF de CPD sintético al ADNc D46/6120 escindido de forma similar. pRSV_Min L contiene un fragmento BamHI-KasI de 6750 pb con la secuencia codificante CPD del ORF L que se transfirió al ADNc D46/6120 escindido de forma similar. pRSV_Min FLC (FLC para clon de longitud completa) contenía la totalidad de los genes codificantes CPD del RSV. Este plásmido de longitud completa se generó transfiriendo sucesivamente los tres fragmentos CPD sintetizados (NotI-XhoI, XhoI-BamHI y BamHI-KasI) al ADNc D46/6120. Tras la generación de preparaciones de ADN libres de endo (Qiagen, Valencia, CA), se confirmó la secuencia de wt y de los cuatro plásmidos CPD mediante el análisis de secuencia de las secuencias del antígeno del RSV contenidas en los plásmidos de ADNc.

30 Para generar virus recombinantes a partir de un genoma de RSV wt o de los genomas de ADNc de RSV CPD (pRSV_Min A, pRSV_Min B, pRSV_Min L y pRSV_Min FLC) se cultivaron células BSR T7/5 (una variante de las células de riñón de hámster bebé 21 (BHK-21) que expresan constitutivamente la ARN polimerasa T7) hasta 95 % de confluencia en placas de 6 pocillos. Antes de la transfección, las células se lavaron dos veces con GMEM que contenía 3 % de FBS, 1 mM de 1-glutamina y un 2 % de aminoácidos MEM antes de añadir 2 ml de medio por pocillo. Las células se transfectaron utilizando Lipofectamine 2000 y una mezcla de plásmidos que contenía 5 µg del plásmido completo (Fig 1A), 2 µg de pTM1-N (que codifica la proteína N del RSV wt) y pTM1-P (que codifica la proteína N del RSV wt), y 1 µg de pTM1-M2-1 (que codifica la proteína N del RSV wt) y pTM1-L (que codifica la proteína N del RSV wt). Tras una incubación de una noche a 37°C, las células transfectadas se cosecharon por raspado en el medio, se añadieron a monocapas subconfluentes de células Vero y se incubaron a 32°C. Los virus rescatados rRSV, rRSV_Min A (Min A), rRSV_Min B (Min B), rRSV_Min L (Min L) y rRSV_Min FLC (Min FLC) se cosecharon entre 11 y 14 días después de la transfección.

40 Tras el rescate, se generaron licores madre de virus raspando las células infectadas en el medio, seguido de vortex durante 30 segundos, clarificación del sobrenadante por centrifugación y adición de 10x SPG (2,18 M sacarosa, 0,038 M KH₂PO₄, 0,072 M K₂HPO₄, 0,06 M 1-glutamina a pH 7,1) hasta una concentración final de 1x. Las alícuotas de virus se congelaron y almacenaron a -80 °C. Los títulos del virus se determinaron mediante un ensayo de placas en células Vero con una superposición de metilcelulosa al 0,8 %. Tras una incubación de 10 a 12 días a 32°C, las placas se fijaron con metanol frío al 80 % y las placas se visualizaron mediante inmunotinción con un cóctel de tres anticuerpos monoclonales específicos del RSV. Los títulos se expresaron como unidad formadora de placa (ufp) por ml. Se aisló ARN viral de todas las cepas de virus y se realizó un análisis de la secuencia de los genomas virales utilizando fragmentos PCR solapados, lo que confirmó que las secuencias genómicas de los virus recombinantes eran correctas. Las únicas secuencias que no se confirmaron directamente para cada genoma fueron las posiciones de los cebadores más externos, a saber, los nt 1-29 y 1562-15089.

Ejemplo 2: Cinética de la replicación *in vitro* del rRSV CPD

55 Para evaluar las características de los RSV CPD se realizaron experimentos de replicación de ciclo múltiple y de ciclo único en células Vero. En los experimentos de replicación multiciclo, se infectaron por triplicado cultivos monocapa confluentes de células Vero en placas de 6 pocillos con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 y se incubaron a 32 o 37°C. Los virus se cosecharon diariamente del día 1 al 14 (con la excepción de Min B, cuyo bajo título de licor madre sólo permitió tener puntos temporales del día 1 al 12 a 32°C) raspando las células infectadas en el medio

seguido de vortex durante 30 segundos, clarificación del sobrenadante por centrifugación. Las alícuotas de virus se congelaron y almacenaron a -80 °C hasta la valoración descrita anteriormente. Después de todas las inoculaciones, se confirmaron las MOI por retro-titulación del inóculo en células Vero a 32°C.

5 A 32°C, el crecimiento de todos los virus CPD se retrasó en comparación con el rRSV; el rRSV alcanzó su título máximo de 10⁷ ufp/ml en el día 7, mientras que Min A, Min L y Min FLC alcanzaron el título máximo en el día 14. El título máximo de Min L fue sólo tres veces inferior al de rRSV. Min A y Min FLC tenían un crecimiento ligeramente más restringido, ya que sus títulos máximos eran unas 15 y 30 veces inferiores a los del rRSV, respectivamente. Sorprendentemente, Min B fue el más restringido para la replicación, ya que su título máximo en el día 12 fue alrededor de 100 veces menor que el de rRSV. A 37°C, el rRSV se replicó más rápidamente que a 32°C, pero alcanzó títulos máximos similares (alrededor de 10⁷ ufp/ml el día 4). A 37°C, los virus CPD también alcanzaron sus títulos máximos antes [en el día 4 (Min A, Min FLC) o en el día 8 (Min L)]. Min A alcanzó aproximadamente los mismos títulos máximos a 32°C y a 37°C (aproximadamente 10⁵ ufp/ml). Sorprendentemente, a pesar de la misma secuencia de aminoácidos de todos los virus, la restricción del crecimiento a 37°C fue incluso mayor que a 32°C para Min L y Min FLC, que mostraron una restricción del crecimiento de aproximadamente 100.000 y 1.000.000 veces en comparación con el rRSV, respectivamente.

Una placa es el resultado de varios ciclos de replicación del virus, de modo que cualquier diferencia en las tasas de replicación puede correlacionarse con el tamaño de la placa. En comparación con el rRSV, que indujo grandes placas en células Vero a 32°C, Min A y Min L indujeron pequeñas placas, y Min B y Min FLC indujeron microplacas (Fig 1C).

Ejemplo 3: La desoptimización de pares de codones de gran extensión afecta a la infectividad específica del RSV

25 Se realizaron experimentos para evaluar la infectividad de los virus CPD en comparación con el rRSV utilizando una qRT-PCR de cadena específica diseñada para cuantificar el ARN genómico viral (Fig. 1D). Se purificó el ARN viral de los licores madres de virus cultivados a 32 °C utilizando licores madre de virus libres de células con títulos conocidos. El ARN genómico correspondiente a 2,7×10⁴ ufp de cepas de virus rRSV, Min A, Min L y Min FLC se cuantificó en ensayos Taqman®. En un experimento típico, Min A y Min L mostraron la misma abundancia de copias de ARN genómico por 2,7×10⁴ unidades formadoras de placa que el rRSV. Sin embargo, la misma cantidad de 2.7×10⁴ unidades formadoras de placa del licor madre de virus Min FLC contenía 17,5 veces más ARN genómico que el rRSV, Min A o Min L. Esto sugiere que la desoptimización de pares de codones de longitud completa del RSV reduce en gran medida su infectividad específica.

Ejemplo 4: Sensibilidad a la temperatura del CPD RSV.

Se realizaron estudios para determinar la temperatura de desconexión (T_{SH}) de los virus CPD en células Vero y Hep2 (Tabla 2). La T_{SH} se define como la temperatura restrictiva más baja a la que se produce una reducción del título del virus en comparación con la temperatura permisiva 32°C que es 100 veces o superior.

40 Como se esperaba, el rRSV no fue sensible a la temperatura tanto en células Vero como Hep2. Confirmando los resultados obtenidos en el experimento de replicación multiciclo, la replicación de Min A tampoco fue sensible a la temperatura, ya que su T_{SH} fue de 40°C tanto en células Vero como Hep2. Min B tenía una T_{SH} de 38°C y 39°C en células Vero y Hep2, respectivamente. Min L fue más sensible a la temperatura, con un T_{SH} de 37 °C y 38 °C en células Vero y Hep2, respectivamente. Por último, Min FLC fue el virus más sensible a la temperatura, con un T_{SH} de 35°C y 36°C en células Vero y Hep2, respectivamente.

Tabla 2: Sensibilidad a la temperatura de los RSV desoptimizados en pares de codones en células Hep2 y Vero.

Título del virus (en log ₁₀ UPF por ml) a la temperatura indicada (°C) ^a		32	35	36	37	38	39	40	T _{SH} ^b
Virus	Línea celular								
Min A	Vero	7,2	6,6	6,2	6,1	5,7	5,4	4,4	40
Min B		4,2	3,1	3,2	2,8	<u>2,0</u>	1,7	<1	38
Min L		7,5	7,1	6,5	<u>5,2</u>	4,2	<1	<1	37
Min FLC		6,7	<u>4,5</u>	3,4	<1	<1	<1	<1	35
WT		8,4	8,3	8,3	8,0	8,1	8,1	8,1	>40
Min A	HEp-2	7,1	6,7	6,6	6,4	6,3	5,6	<u>4,8</u>	40
Min B		4,0	4,0	4,0	4,0	3,7	<u>2,0</u>	<1	39
Min L		7,6	7,1	6,7	6,1	<u>4,5</u>	3,2	2,3	38
Min FLC		6,5	5,0	<u>4,0</u>	2,0	<1	<1	<	36
WT		8,3	8,1	8,3	8,3	8,1	8,3	8,1	>40

(continuación)

Título del virus (en log ₁₀ UPF por ml) a la temperatura indicada (°C) ^a									
Virus	Línea celular	32	35	36	37	38	39	40	T _{SH} ^b
^a El fenotipo <i>ts</i> de cada virus se evaluó mediante ensayo de placa en células Vero y HEP-2 a las temperaturas indicadas. Para los virus con fenotipo <i>ts</i> , las temperaturas de desconexión están marcadas (subrayadas). Véase la nota b para la definición de temperatura de desconexión. ^b La temperatura de desconexión (T _{SH}) se define como la temperatura restrictiva más baja a la que la reducción comparada con 32°C es 100 veces o superior a la observada para RSV <i>wt</i> a las dos temperaturas. El fenotipo <i>ts</i> se define por tener una T _{SH} de 40° C o menos (negrita).									

Ejemplo 5: Transcripción reducida de los CPD rRSV *in vitro*.

5 Para investigar en qué paso(s) se produjo la restricción del crecimiento de los virus CPD, se realizaron experimentos para evaluar el ARNm/antigenoma viral y la síntesis del genoma, proteínas y producción de partículas virales en células Vero en un experimento de replicación de un solo paso de 4 a 24 horas postinfección (hpi) a 32 y 37 °C. El ARN total se utilizó para cuantificar el sentido positivo (antigenómico y ARNm) y el sentido negativo (genómico) del ARN del RSV mediante ensayos Taqman[®] específicos de cadena. Se utilizaron lisados de proteínas para analizar la síntesis de proteínas víricas mediante Western blot.

15 Como se muestra en la figura 2, el rRSV exhibió una fuerte transcripción de genes virales tan pronto como a las 8 hpi, y la transcripción fue más eficiente a 37°C que a 32°C (aumento de 14 y 6 veces de 4 a 8 hpi a 37°C y 32°C, respectivamente; Fig 2A). La transcripción máxima del gen se alcanzó a las 16 hpi (aumento de 188 y 196 veces del ARN de sentido positivo a 32°C o 37°C, respectivamente). En comparación con el rRSV, todos los virus CPD mostraron una transcripción reducida. La transcripción del gen Min A se retrasó, y se redujo en comparación con el rRSV, tanto a 32°C como a 37°C. Los primeros transcritos de Min A se detectaron sólo a las 12 hpi (aumento de 3 y 21 veces del ARN sentido positivo de 4 a 12 horas a 32°C y 37°C, respectivamente). La transcripción máxima de Min A fue inferior a la de rRSV tanto a 32°C como a 37°C (un aumento de 41 veces de ARNm/ARN antigenómico de 4 a 24 hpi a 32°C, y un aumento de 129 veces a 20 hpi a 37°C). La transcripción del gen Min L también se redujo, ya que los primeros transcritos del virus se detectaron sólo a las 16 hpi a 32°C a niveles muy modestos (un aumento de 1,5 veces de las 4 hpi a las 16 hpi; transcripción máxima a las 24 hpi con sólo un aumento de 6 veces en comparación con las 4 hpi). La transcripción no fue más eficiente a 37°C, ya que se detectó un aumento del ARN en sentido positivo a partir de las 16 hpi (un aumento de 4 veces en comparación con el punto temporal de 4 horas), con una transcripción máxima a las 24 hpi (aumento de 5 veces). La transcripción del gen Min FLC fue la menos eficiente, ya que se detectó un pequeño aumento de ARN sentido positivo sólo 24 hpi a 32°C (aumento de 1,3 veces en comparación con 4 hpi), y fue completamente ineficaz a 37°C, sin aumento con el tiempo.

30 La reducción de la transcripción génica del virus en las células infectadas con los virus CDP dio lugar a una reducción de la síntesis de proteínas. En las células infectadas con rRSV, se detectó un aumento de la proteína N del RSV antes (a las 12 hpi y 16 hpi a 37°C y 32°C, respectivamente) que en las células infectadas con Min L y Min FLC; el rRSV produjo niveles más altos de expresión de la proteína N que cualquiera de los tres virus Min tanto a 32 como a 37°C (Fig 2B y C).

35 **[0078]** La producción de ARN genómico fue paralela a la producción de partículas de virus y, como era de esperar, se retrasó en comparación con la transcripción del gen del virus. El ARN genómico del rRSV y las partículas de virus se detectaron ya a las 12 hpi y aumentaron hasta las 24 horas pi. Todos los virus CPD mostraron una síntesis retardada y reducida de ARN genómico y producción de partículas virales. De hecho, a 32°C, se detectó un aumento del ARN genómico de Min A y las primeras partículas de virus a las 20 hpi. A 37°C, se detectó ARN genómico de Min A a las 12 hpi y las primeras partículas de virus estaban presentes a las 16 hpi. El ARN genómico de Min L y la liberación de partículas también se retrasaron mucho en comparación con el rRSV. A 32 y 37°C, se detectaron los primeros ARN genómicos, así como las primeras partículas de virus a las 24 hpi. Por último, a 32°C se detectó ARN genómico de Min FLC y partículas de virus a las 24 hpi, mientras que a 37°C no se detectó síntesis de ARN genómico ni liberación de partículas de virus.

Ejemplo 6: La replicación de los CPD rRSV se reduce en ratones Balb/c.

50 La replicación de los CPD rRSV en comparación con el rRSV se evaluó en ratones (Fig 3). Como era de esperar, se detectó rRSV en los cornetes nasales (NT) en 8 de cada 10 ratones en los días 4 y 5 (mediana de replicación de 10³ ufp/g). Min A y Min L sólo se detectaron en los NT de un total de dos de 10 ratones (un ratón positivo cada día), mientras que Min FLC no se detectó en los NT de ningún ratón ningún día (p<0,05 en comparación con rRSV). En los pulmones, el título del rRSV alcanzó 10³ y 10⁴ ufp/g en los días 4 y 5, respectivamente. La replicación de Min A se redujo significativamente en comparación con el rRSV y sólo se detectó en dos ratones el día 4. El día 5, 4 de cada 5 ratones presentaban replicación del virus. Sin embargo, el título era aproximadamente 10 veces inferior al del rRSV (p<0,05). La replicación de Min L sólo se redujo ligeramente, ya que su título fue sólo dos veces inferior al del rRSV el día 4, y cinco veces inferior el día 5 (p>0,05). Por último, no se detectó Min FLC en ningún ratón en el día 4 o 5 (p<0,01

y $p < 0,001$ en el día 4 y 5, respectivamente), lo que demuestra que este virus está fuertemente atenuado en ratones. En conjunto, estos resultados muestran que Min A y Min FLC están atenuados en ratones.

Ejemplo 7: La replicación de los CPD rRSV se reduce en los monos verdes africanos.

5 Se realizaron estudios para evaluar la replicación de los CPD rRSV en primates no humanos (Tabla 3, 4 y Fig 4). Se inoculó a monos verdes africanos (MGA) en grupos de cuatro por vía intranasal e intratraqueal con 1×10^6 ufp de Min A, Min L, Min FLC o rRSV por MGA. Los títulos del virus se evaluaron a partir de hisopos NP y muestras TL de 0 a 12 días.

10 Mientras que Min FLC no se replicó en el tracto respiratorio superior, la excreción del virus de los animales inoculados con Min A y Min L fue ligeramente retrasada y de menor duración en comparación con los animales inoculados con rRSV. Los títulos máximos de Min A y Min L fueron ligeramente inferiores a los de rRSV. En el tracto respiratorio inferior, todos los CPD rRSV se replicaron mal en comparación con el rRSV (100 veces menos que el rRSV; $p < 0,05$).

15 A pesar de la fuerte restricción de replicación de los CPD rRSV, Min A y Min L indujeron una respuesta eficiente de anticuerpos neutralizantes (sin diferencias significativas entre rRSV, Min A y Min L). Sin embargo, como consecuencia de una replicación ineficiente, Min FLC fue el único virus que indujo una pobre respuesta de anticuerpos ($p < 0,05$ en comparación con rRSV wt).

Tabla 3: Títulos virales de muestras de lavado nasal de primates no humanos inoculados con Min A, Min L, Min FLC o WT^a.

Virus	Identificación animal	Duración de la Excreción ^c												Suma de los títulos diarios ^d	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12			
Min A	7197	-	-	-	-	1,2	<u>1,7</u>	-	-	-	-	-	2	1,7	2,9
	7289	-	-	-	-	<u>2,0</u>	1,7	-	-	-	-	-	2	2,0	3,7
	7502	-	-	-	-	-	<u>2,6</u>	1,3	-	-	-	-	2	2,6	3,9
	7737	-	-	-	1,7	<u>2,5</u>	2,0	-	-	-	-	-	3	2,5	6,2
	Media:												2,3	2,2	4,2
Min L	7739	-	-	-	-	1,2	-	<u>2,6</u>	1,4	1,0	-	0,7	7	2,6	7,9
	7280	-	-	-	-	<u>2,2</u>	2,0	1,5	0,7	-	-	-	4	2,2	6,4
	7821	-	-	-	-	-	-	0,7	-	<u>1,3</u>	1,0	-	4	1,3	3,5
	7740	-	-	-	-	2,8	<u>3,3</u>	2,7	3,1	2,4	-	-	5	3,3	14,3
	Media:												5,0	2,4	8,0
Min FLC	7444	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	<0,5	-
	7431	-	-	-	-	<u>1,7</u>	-	-	-	0,7	-	-	5	1,7	3,9
	7798	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	<0,5	-
	7632	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	<0,5	-
	Media:												1,3	0,4	1,0
WT	7489	-	-	1,2	2,9	3,3	<u>3,5</u>	2,0	3,3	3,0	1,8	-	8	3,5	21,0
	7538	-	-	1,2	-	2,0	<u>2,8</u>	<u>3,0</u>	2,5	2,2	-	-	7	3,0	14,2
	7370	-	-	-	-	-	<u>2,0</u>	-	-	1,9	1,3	1,7	6	2,0	7,9
	7667	-	-	-	-	3,6	-	<u>3,7</u>	2,0	-	-	-	4	3,7	9,8
	Media:												6,3	3,1	13,2

^a Los primates no humanos fueron inoculados por las vías intranasal e intratraqueal combinadas con 10^6 UPF del virus indicado en un inóculo de 1 ml por sitio (dosis total = 2×10^6 UPF animal).

^b El lavado nasal se realizó con 2 ml de medio Leibovitz L-15 con $1 \times$ SP utilizado como estabilizador. Las valoraciones del virus se realizaron en células Vero a 32°C. El límite inferior de detección fue de $0,7_{\log_{10}}$ UPF/ml de solución de lavado nasal. Las muestras sin virus detectable se representan como "-". Los títulos máximos de cada animal están subrayados.

^c Periodo de días desde el primero hasta el último día en el que se detectó el virus, incluyendo los días negativos (si los hubiera) intermedios.

^d La suma de los títulos diarios se utiliza como estimación de la magnitud de la excreción (área bajo la curva). Se utilizó un valor de 0,5 para las muestras sin virus detectable.

Tabla 4: Títulos virales de muestras de lavado broncoalveolar y traqueal de primates no humanos inoculados con Min A, Min L, Min FLC o WT ^a.

Virus	Identificación de animales	Título del virus del lavado traqueal (log ₁₀ PUF/ml) en los días de Excreción ^c						Duración de la máxima excreción ^c	Título máximo del virus	Suma de títulos diarios ^d
		2	4	6	8	10	12			
Min A	7197	<u>1,3</u>	-	<u>1,3</u>	<u>1,3</u>	-	-	7	1,3	4,9
	7289	1,0	1,3	<u>1,6</u>	-	<u>1,6</u>	-	9	1,6	6,5
	7502	-	<u>2,1</u>	1,8	1,5	-	-	6	2,1	5,4
	7737	-	-	1,3	<u>2,0</u>	-	-	3	2,0	3,3
	Media:							6,3	1,8	5,0
Min L	7739	-	1,5	-	<u>2,0</u>	-	1,6	9	2,0	7,1
	7280	-	-	-	<u>1,0</u>	-	-	1	1,0	1,0
	7821	-	-	-	<u>1,0</u>	-	-	1	1,0	1,0
	7740	-	-	<u>1,6</u>	1,5	<u>1,6</u>	-	5	1,6	4,7
	Media:							4,0	1,4	3,5
Min FLC	7444	-	-	-	-	-	-	0	<1,0	-
	7431	-	-	-	-	-	-	0	<1,0	-
	7798	-	-	-	-	<u>2,3</u>	-	1	2,3	2,3
	7632	-	-	-	-	-	-	0	<1,0	-
	Media:							0,3	1,3	0,6
WT	7489	2,3	-	2,6	<u>3,3</u>	2,6	1,5	11	3,3	13,3
	7538	1,5	1,5	2,5	<u>2,7</u>	2,4	2,3	11	2,7	12,9
	7370	2,0	2,2	<u>4,2</u>	1,9	1,3	1,5	11	4,2	13,1
	7667	1,5	2,9	<u>4,1</u>	2,9	-	-	7	4,1	11,4
	Media:							10,0	3,6	12,7

^a Los primates no humanos fueron inoculados por las vías intranasal e intratraqueal combinadas con 10⁶ UPF del virus indicado en un inóculo de 1 ml por sitio (dosis total = 2×10⁶ UPF por animal).

^b En los días 2, 4, 6 y 8, se realizó un lavado broncoalveolar con 3 ml de PBS y se mezcló 1:1 con medio L15 con 2x SP. Las valoraciones del virus se realizaron en células Vero a 32°C. El límite inferior de detección fue de 1,0 log₁₀ UPF/mL de solución de lavado. Las muestras sin virus detectable se representan como "-". Los títulos máximos de cada animal están subrayados.

^c Periodo de días desde el primero hasta el último día en el que se detectó el virus, incluyendo los días negativos (si los hubiera) intermedios.

^d La suma de los títulos diarios se utiliza como estimación de la magnitud de la excreción (área bajo la curva). Se utilizó un valor de 1,0 para las muestras sin virus detectable.

Ejemplo 8: Crecimiento de Min L y Min FLC a temperaturas restrictivas crecientes.

- 5 Diez cultivos replicados de Min L (Fig. 5A) y Min FLC (Fig. 5B) se cultivaron en serie a una temperatura restrictiva creciente empezando por la temperatura de cierre (37 y 35°C para Min L y Min FLC, respectivamente) con un MOI de entrada de 0,1 ufp/célula hasta que se observó una citopatología máxima (entre el día 7 y el 14). Se realizaron dos pasajes para una temperatura dada antes de aumentarla en 1°C. Paralelamente, como control, se cultivaron muestras duplicadas de ambos virus en células Vero de la misma forma, pero a 32°C únicamente (temperatura no restrictiva).
- 10 Para cada pasaje, se utilizó 1 ml (de 5 ml) del sobrenadante para inocular el siguiente pasaje. Para cada pasaje, se congelaron alícuotas para la valoración y el análisis de secuencias. El título del virus se determinó por duplicado mediante un ensayo de placas en células Vero a la temperatura permisiva (32°C). El análisis de secuencias reveló tres mutaciones en una única réplica de Min L (Fig. 5C). La proteína N presentaba una mutación en el codón que codifica el aminoácido 136, lo que provocaba un cambio en el aminoácido codificado de lisina a arginina. La proteína P presentaba una mutación en el codón que codifica el aminoácido 114, dando lugar a un cambio en el aminoácido codificado de ácido glutámico a valina. Asimismo, la proteína M2-1 presentaba una mutación en el codón que codifica el aminoácido 88, lo que provocaba un cambio en el aminoácido codificado de asparagina a lisina. La réplica Min L con estas mutaciones mostró sincitios extensos a 39 y 40°C (triángulo rojo relleno en la (Fig. 5A)).
- 15

Ejemplo 9: Generación de rRSV sintéticos desoptimizados en pares de codones derivados del virus Min L y caracterización de su crecimiento en células Vero.

Para evaluar más a fondo las características de los virus que tienen las mutaciones identificadas en la replicación Min L descrita en el Ejemplo 8, se generó un rRSV sintético quimérico de par de codones desoptimizado (CPD) (Min L) basado en la columna vertebral RSV wt (número de acceso Genbank M74568) que contenía un CPD ORF de la proteína polimerasa L. También se crearon formas variantes de este virus con las mutaciones identificadas en N (aa 136), P (aa 114) y M2-1 (aa 88) introducidas en todas las combinaciones posibles (Fig. 6A). A continuación, se determinó la cinética de crecimiento multiciclo. En resumen, se infectaron por duplicado cultivos monocapa confluentes de células Vero en placas de 6 pocillos con rRSV, Min L o Min L que contenían las mutaciones de interés en todas las combinaciones posibles a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 y se incubaron a 32 o 37°C. Los virus se cosecharon diariamente desde el día 1 al 14 raspando las células infectadas en el medio seguido de vórtex, clarificación del sobrenadante por centrifugación y congelación de las alícuotas de virus. Cada alícuota se valoró por duplicado a la temperatura permisiva de 32°C. Para cada punto temporal, se muestra el valor medio del duplicado y la desviación estándar (Fig. 6B). El fenotipo del tamaño de la placa en células Vero a 32°C de rRSV y los CPD rRSVs se muestra en la Fig. 6C. Los resultados que indican la sensibilidad a la temperatura de los RSVs desoptimizados por pares de codones se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: Sensibilidad a la temperatura de los RSVs desoptimizados en pares de codones en células Vero.

Título del virus (en log ₁₀ UPF por ml) a la temperatura indicada (°C) ^a								
Virus	32	35	36	37	38	39	40	T_{SH} ^b
Min L	7,1	6,0	5,4	4,6	3,9	<1	<1	37
Min L-N	6,8	6,3	5,7	5,3	4,3	3,2	<1	38
Min L-P	7,0	6,5	6,1	5,1	4,8	3,3	<1	38
Min L-M21	7,5	7,5	7,5	7,3	6,9	4,8	<1	39
Min L-NP	6,8	6,7	6,3	5,8	4,9	3,8	<1	39
Min L-NM21	7,3	7,3	7,2	7,3	7,1	5,7	<1	40
Min L-PM21	7,4	7,4	7,5	7,3	7,0	6,4	<1	40
Min L-NPM21	7,2	7,1	7,2	7,1	6,9	6,7	3,2	40
WT	7,5	7,5	7,5	7,4	7,4	7,3	6,9	>40

^a El fenotipo *ts* de cada virus se evaluó mediante ensayo de placa en células Vero a las temperaturas indicadas. Para los virus con fenotipo *ts*, las temperaturas de desconexión están marcadas (subrayadas). Véase la nota b para la definición de temperatura de desconexión.

^b La temperatura de desconexión (T_{SH}) se define como la temperatura restrictiva más baja a la que la reducción comparada con 32°C es 100 veces o superior a la observada para RSV wt a las dos temperaturas. El fenotipo *ts* se define por tener una T_{SH} de 40° C o menos (negrita).

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido recombinante que codifica un virus respiratorio sincitial humano atenuado del subgrupo A (RSV),
 5 en el que el polinucleótido recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína L del RSV,
 en la que la proteína L del RSV tiene una secuencia de aminoácidos que difiere como máximo en un residuo de aminoácido de una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1,
 10 en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV es de 75 % a 85 % idéntica a los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1,
 en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV ha sido desoptimizada por pares de codones,
 en la que el sesgo de pares de codones de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV se ha reducido en al menos 0,2 con respecto a los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1,
 15 en la que el RSV humano atenuado del subgrupo A se replica al menos 100 veces menos que el RSV de tipo silvestre en el tracto respiratorio inferior de monos verdes africanos, y
 en el que el RSV humano atenuado del subgrupo A induce anticuerpos neutralizantes en los monos verdes africanos.
- 20 2. El polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV es 79 % idéntica a los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1.
3. El polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína L del RSV comprende los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 5.
- 25 4. El polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína L del RSV está codificada por los nucleótidos 8387 a 14884 de SEQ ID NO: 1.
5. El polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de nucleótidos está desoptimizada por pares de codones para al menos una proteína adicional del RSV seleccionada de: NS1, NS2, N, P, M, SH, G y F.
- 30 6. El polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
- 35 7. El polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un cambio nucleotídico en uno o más de los siguientes:
- 40 a. un cambio en el codón que codifica el aminoácido 136 de la proteína N,
 b. un cambio en el codón que codifica el aminoácido 114 de la proteína P, o
 c. un cambio en el codón que codifica el aminoácido 88 de la proteína M2-1.
- 45 8. El polinucleótido recombinante de la reivindicación 7, en el que cualquiera de los cambios nucleotídicos provoca un aminoácido distinto de:
- 50 a. lisina que se codificará en la posición 136 de la proteína N,
 b. ácido glutámico que debe codificarse en la posición 114 de la proteína P, o
 c. asparagina que se codificará en la posición 88 de la proteína M2-1.
9. Un genoma humano atenuado recombinante del RSV del subgrupo A que comprenda el polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores; o un antigenoma correspondiente que comprenda un polinucleótido complementario al polinucleótido recombinante.
- 55 10. Un genoma humano atenuado recombinante del RSV del subgrupo A que comprende el polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 4 opcionalmente modificado para codificar una o más de las siguientes mutaciones: K136R en la proteína N, E114V en la proteína P y N88K en la proteína M2-1, o SEQ ID NO: 5; o un antigenoma correspondiente que comprenda un polinucleótido complementario al polinucleótido recombinante.
- 60 11. Un RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A que comprenda el genoma del RSV humano recombinante del subgrupo A de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10.
- 65 12. Un procedimiento para producir un RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A, que comprende expresar el genoma del RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10 en

una célula.

13. El RSV recombinante atenuado humano del subgrupo A de la reivindicación 11 para su uso en terapia.

5 14. El RSV humano atenuado recombinante del subgrupo A para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el RSV se administra mediante inyección, administración en aerosol, aerosol nasal, gotitas nasales, inoculación oral o aplicación tópica.

10 15. Una composición de vacuna que comprende el RSV humano recombinante atenuado del subgrupo A de la reivindicación 11.

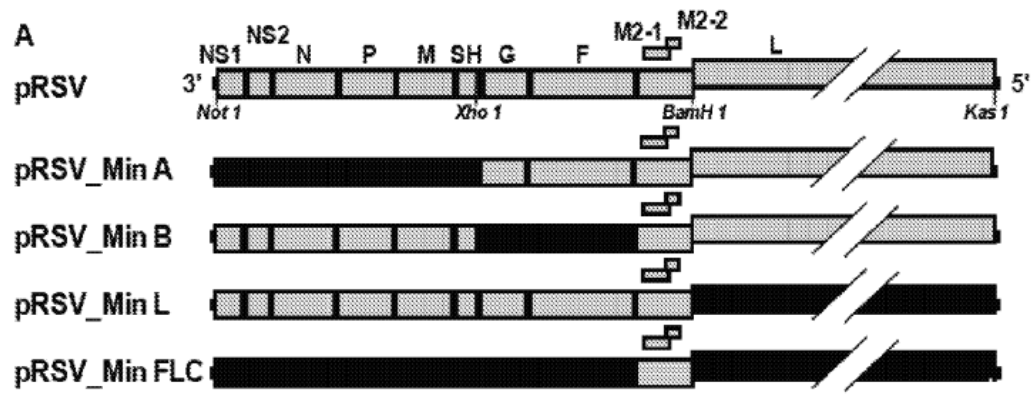


Figura 1

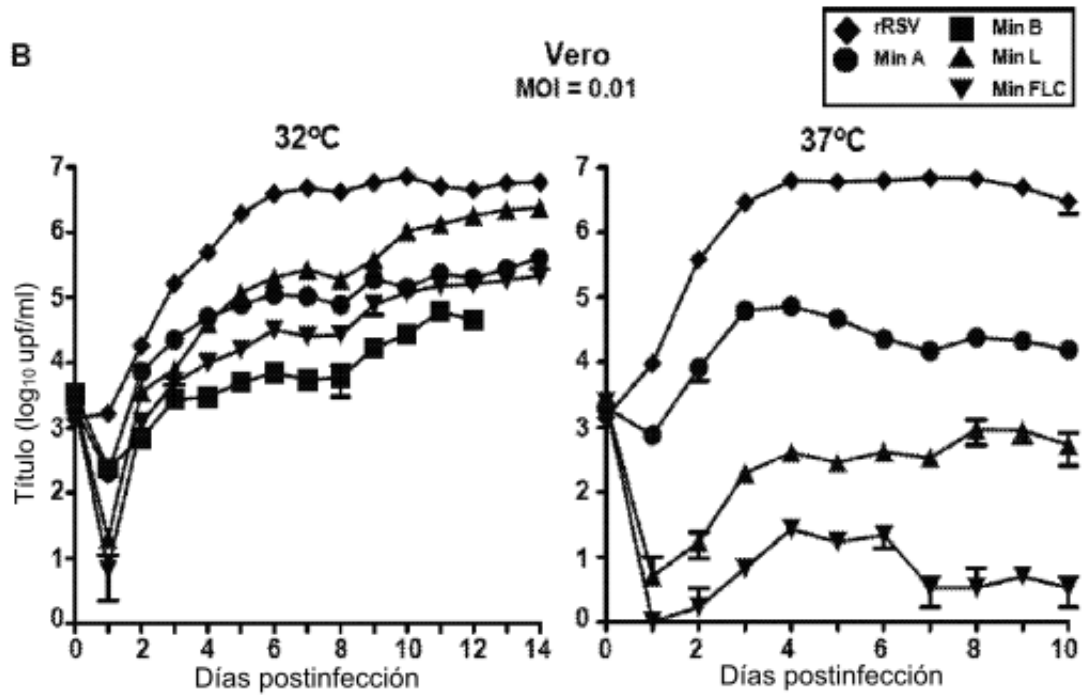


Figura 1 (cont.)

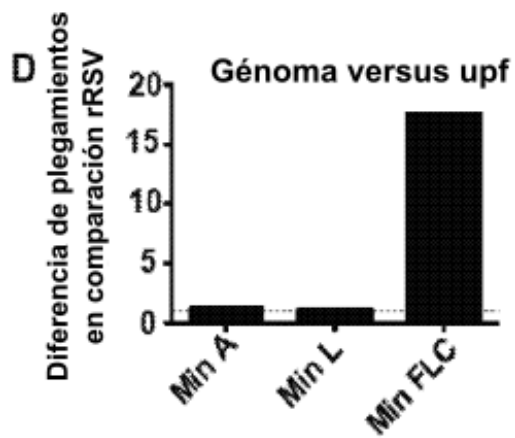
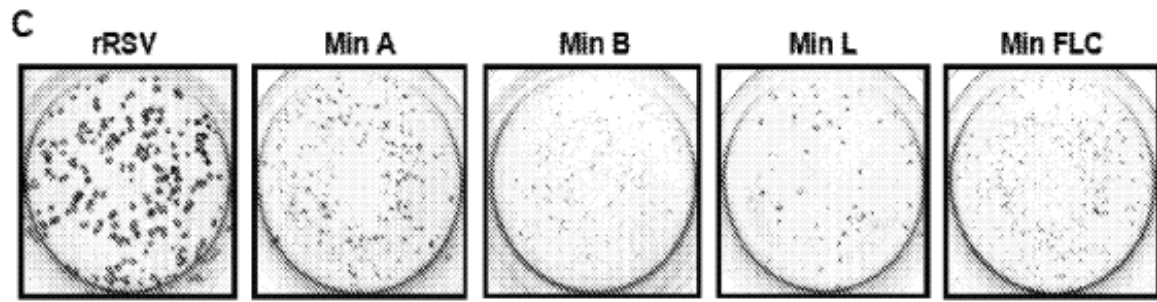


Figura 1 (cont.)

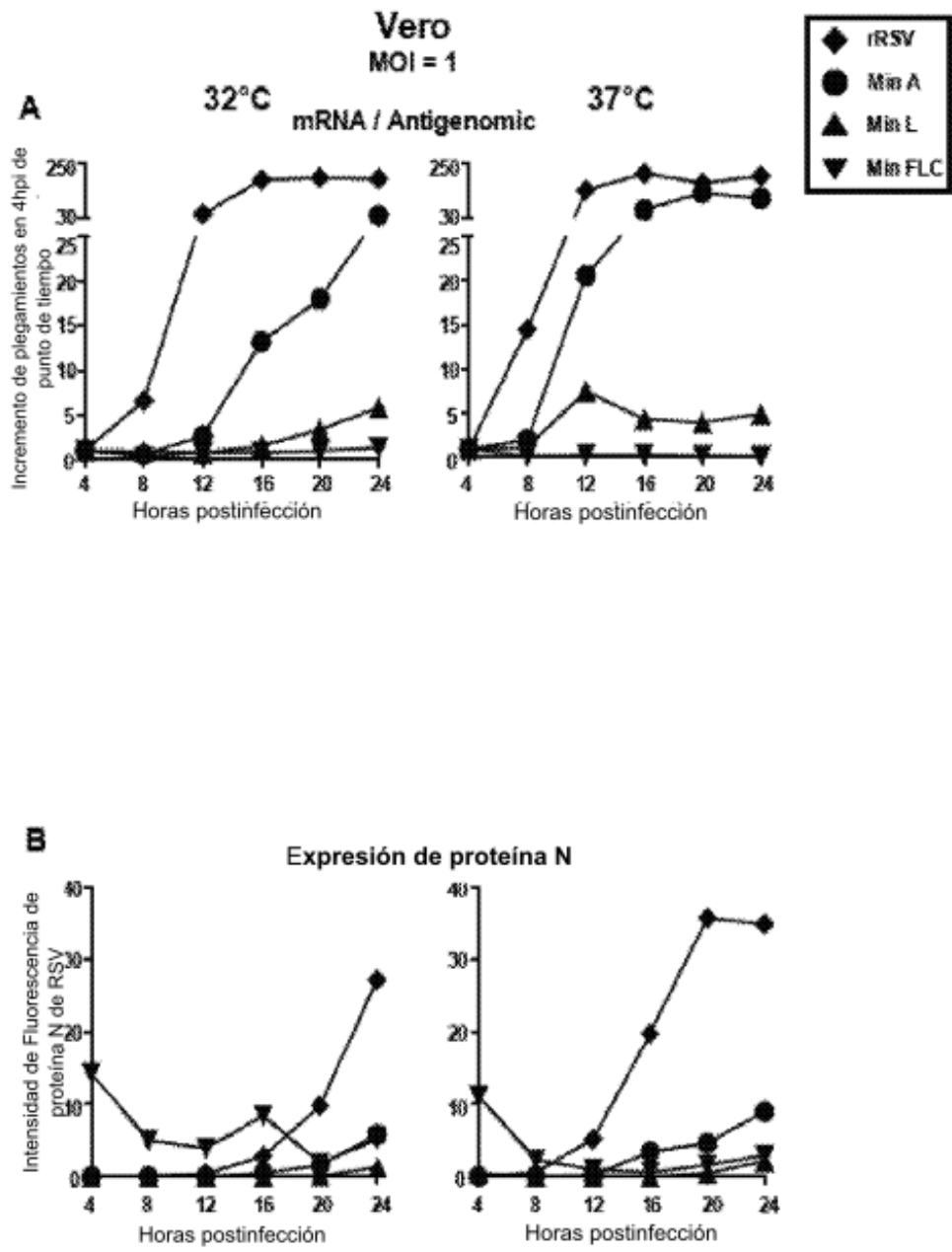


Figura 2

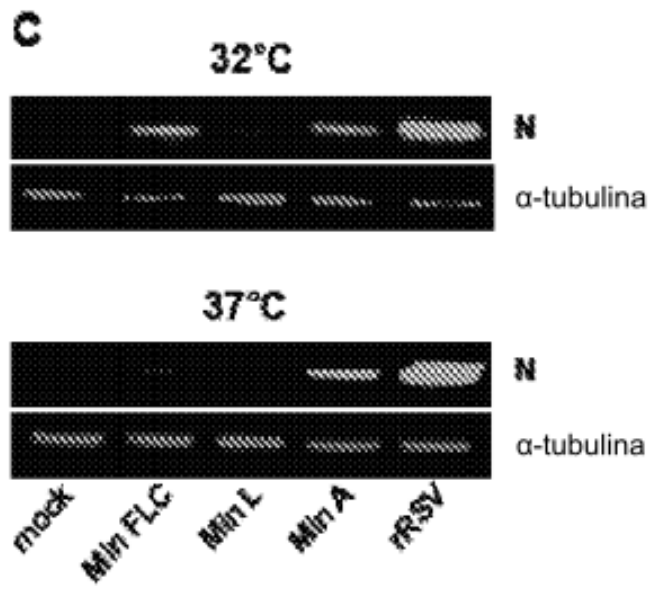


Figura 2 (cont.)

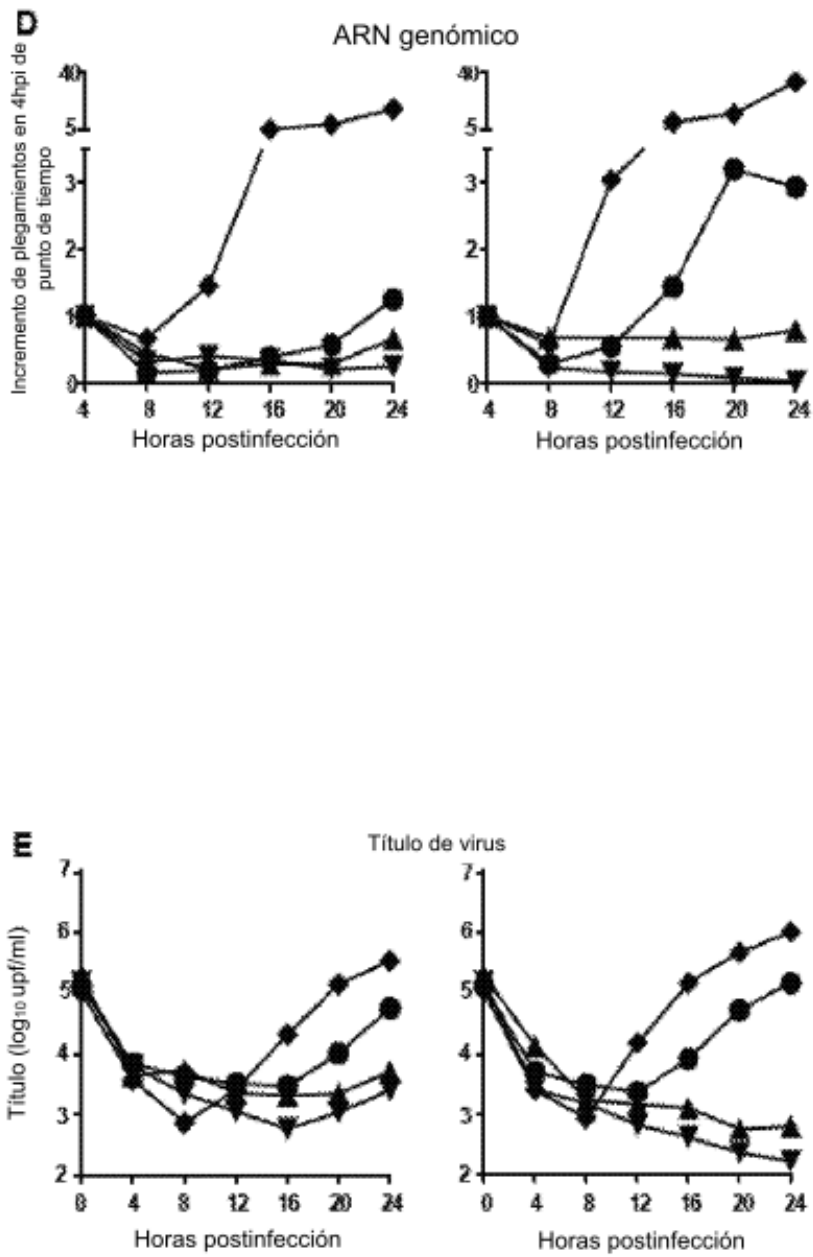


Figura 2 (cont.)

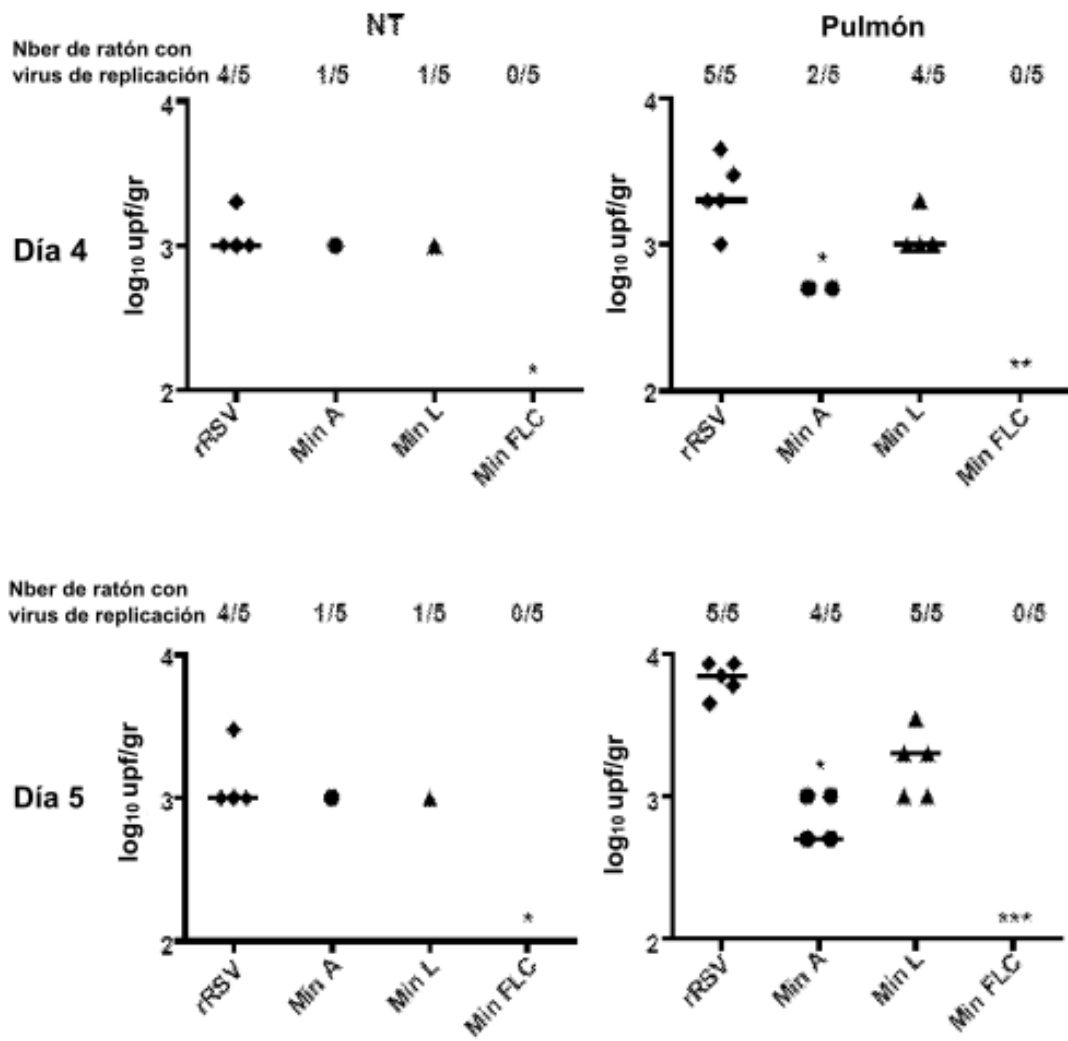


Figura 3

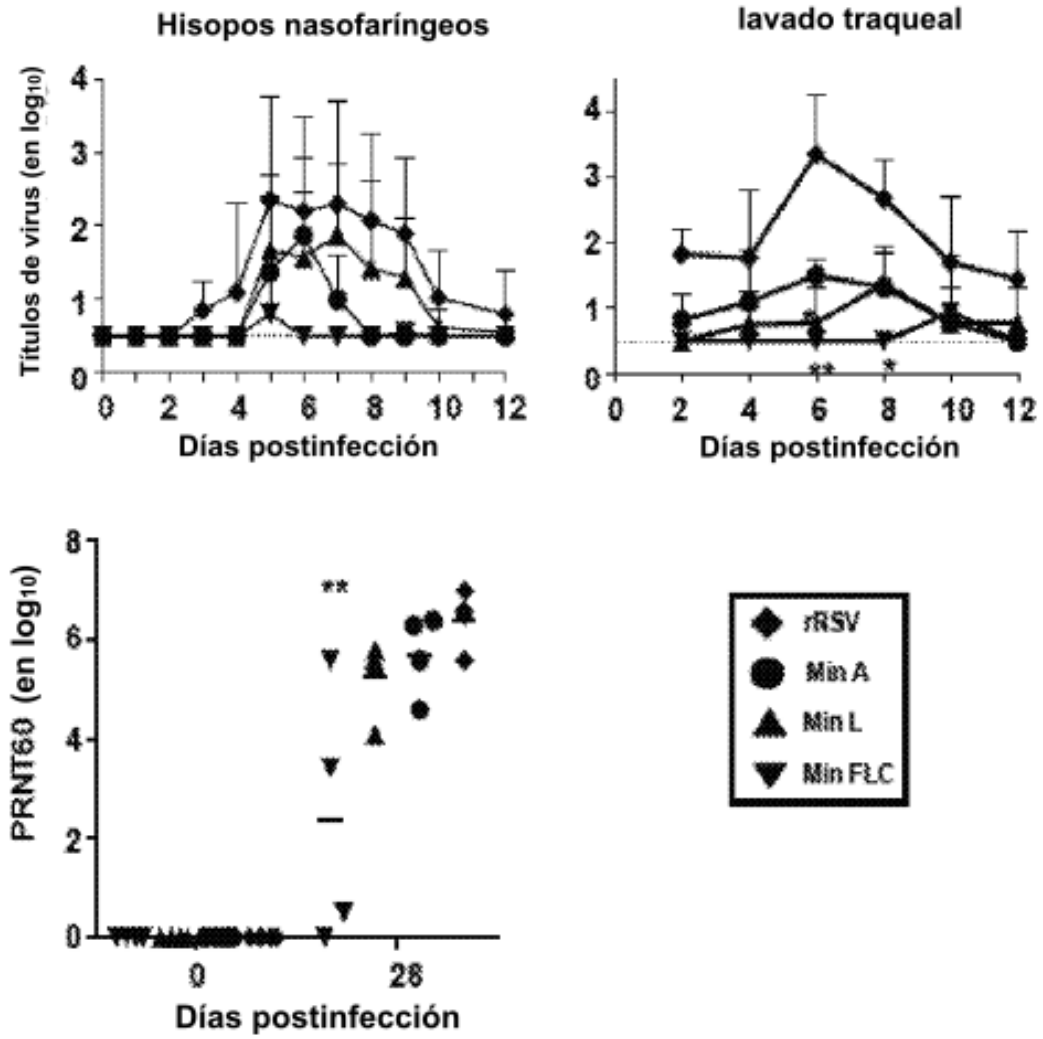


Figura 4

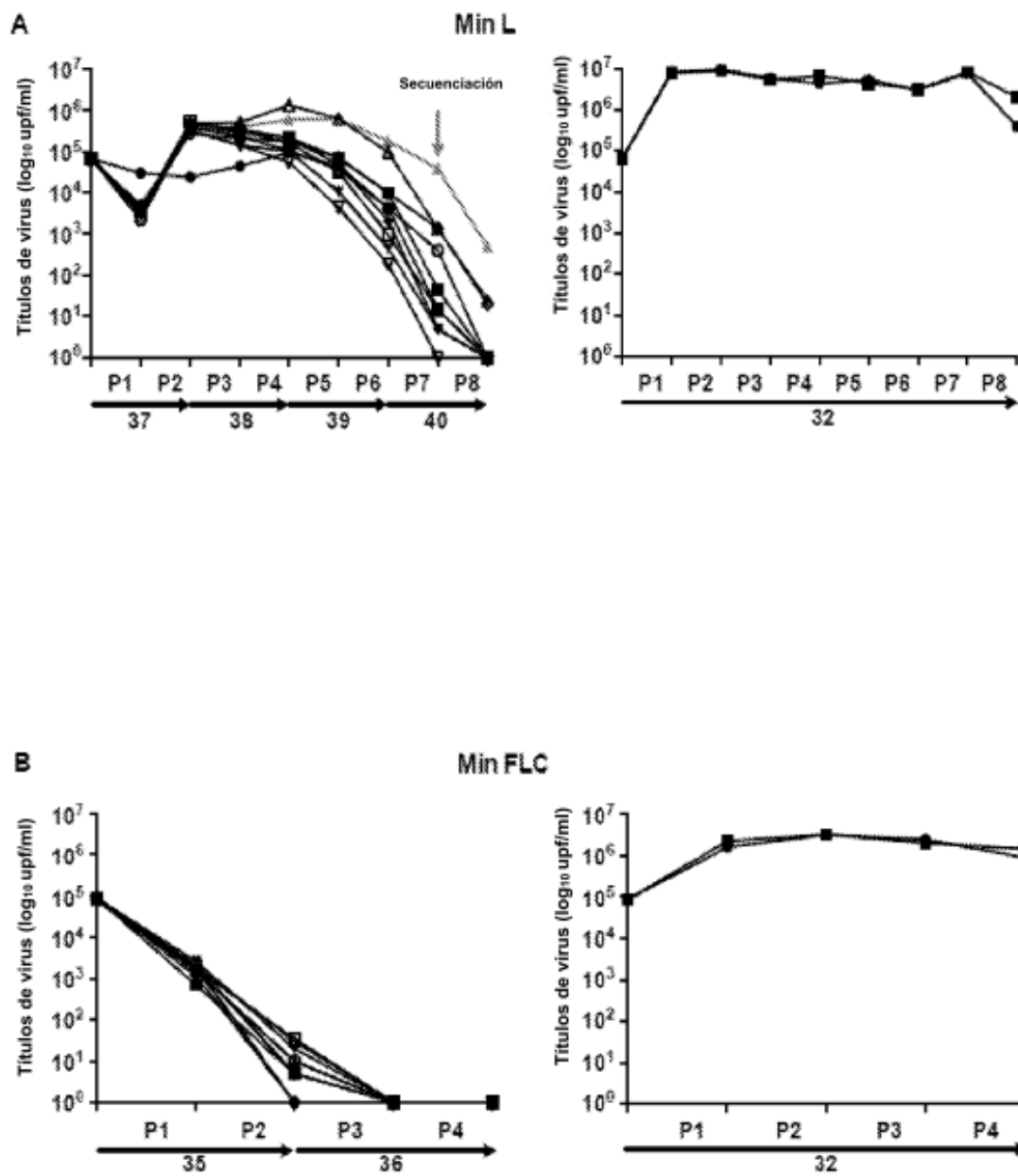


Figura 5

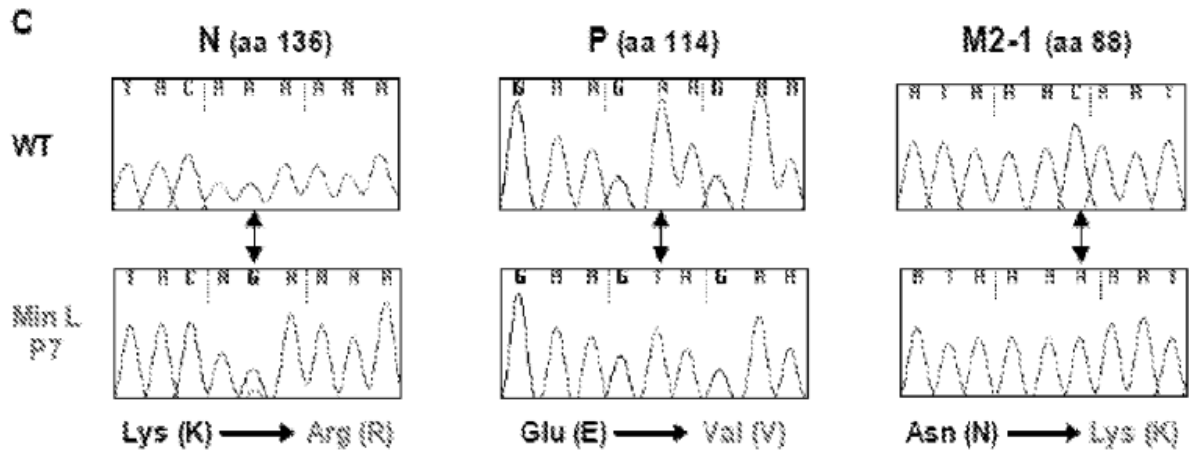


Figura 5 (cont.)

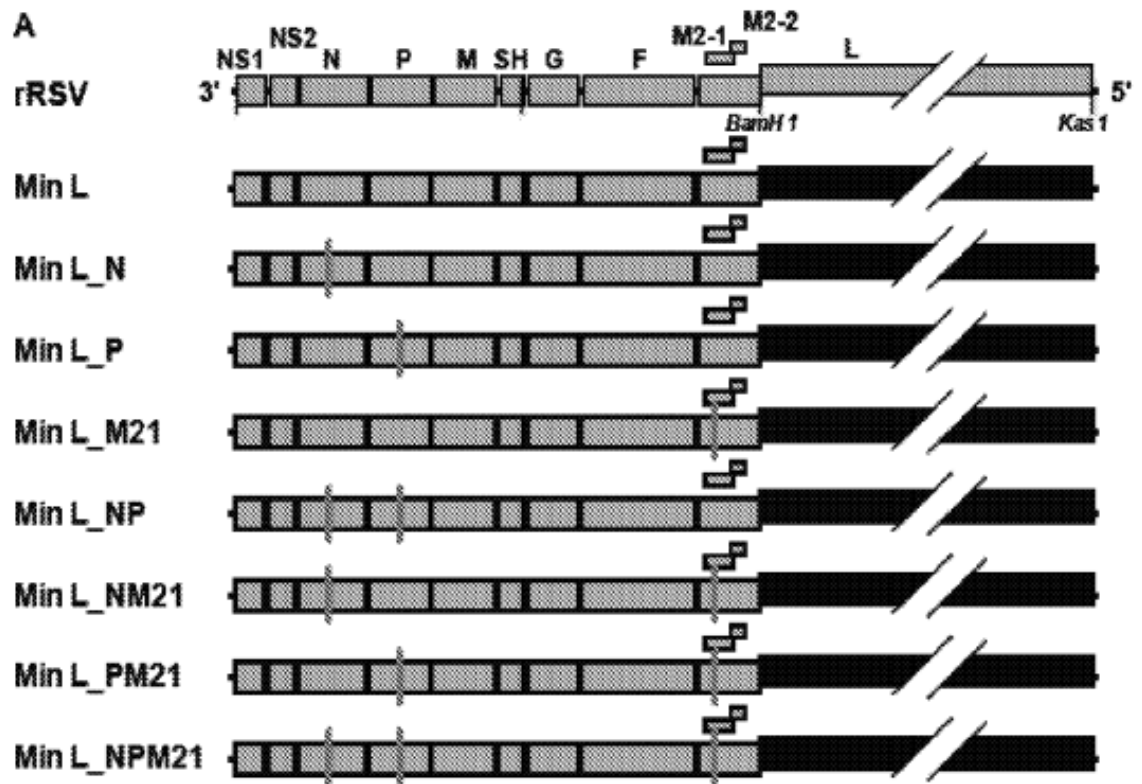


Figura 6

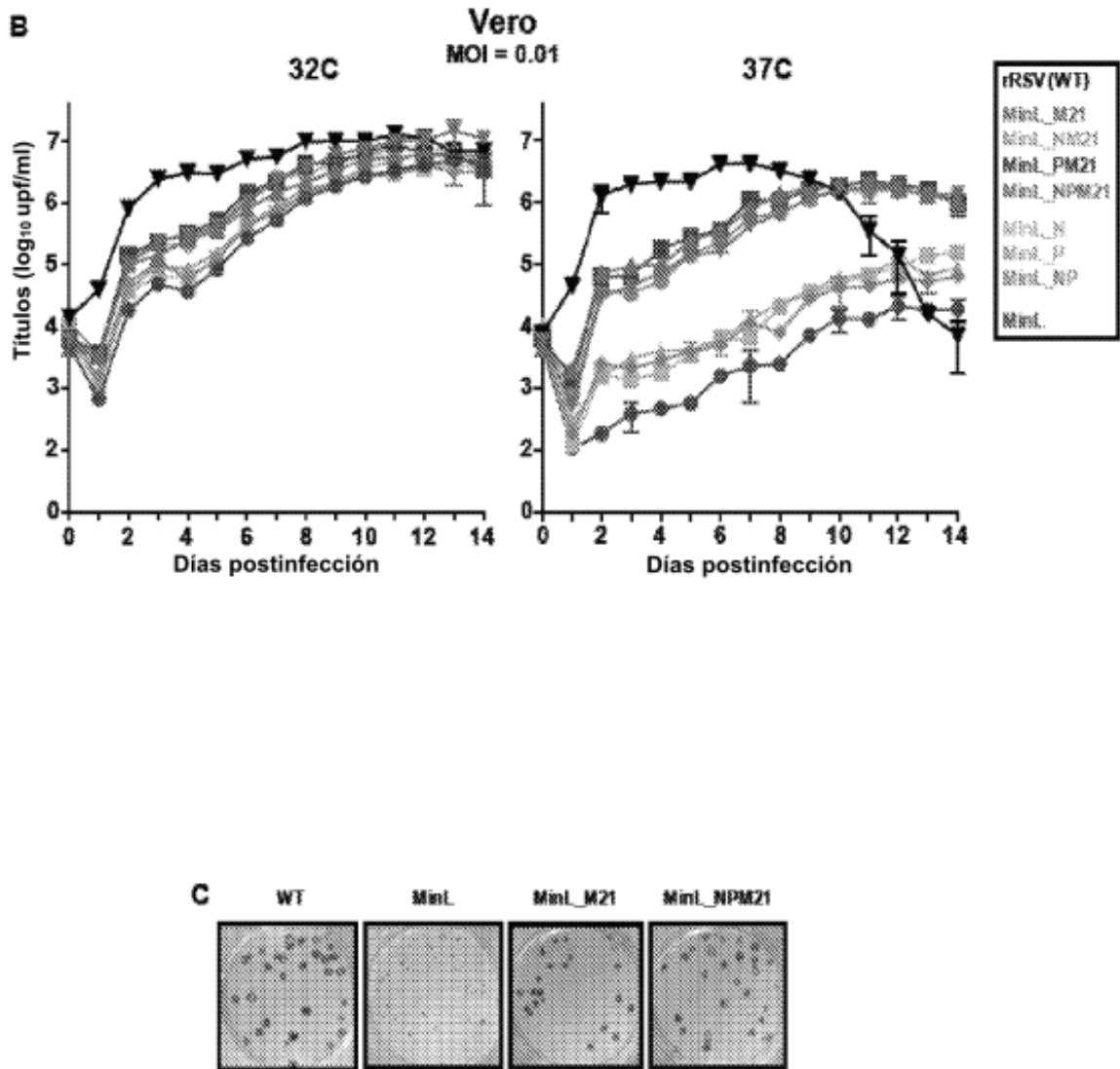


Figura 6 (cont.)

Alineación RSV-WT con Secuencias Min

1	ACGGGAAAAATGCGTACRACAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAATAAGAATT	60	RSV_WT
1	ACGGGAAAAATGCGTACRACAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAATAAGAATT	60	MinA
1	ACGGGAAAAATGCGTACRACAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAATAAGAATT	60	MinB
1	ACGGGAAAAATGCGTACRACAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAATAAGAATT	60	MinL
1	ACGGGAAAAATGCGTACRACAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAATAAGAATT	60	MinFLC

61	TGATAAGTACCACITAAATTTAACTCCCTTGGTTAGAGATGGCAGCAATTCATTGAGTA	120	RSV_WT
61	TGATAAGTACCACITAAATTTAACTCCCTTGGTTAGAGATGGCAGCAATTCATTGAGTA	120	MinA
61	TGATAAGTACCACITAAATTTAACTCCCTTGGTTAGAGATGGCAGCAATTCATTGAGTA	120	MinB
61	TGATAAGTACCACITAAATTTAACTCCCTTGGTTAGAGATGGCAGCAATTCATTGAGTA	120	MinL
61	TGATAAGTACCACITAAATTTAACTCCCTTGGTTAGAGATGGCAGCAATTCATTGAGTA	120	MinFLC

121	TGATAAAGTTAGATTACAAAATTTGTTGCAATGATGAAGTAGCATTGTTAAAAATAA	180	RSV_WT
121	TGATAAAGTTAGATTACAAAATTTGTTGCAATGATGAAGTAGCATTGTTAAAAATAA	180	MinA
121	TGATAAAGTTAGATTACAAAATTTGTTGCAATGATGAAGTAGCATTGTTAAAAATAA	180	MinB
121	TGATAAAGTTAGATTACAAAATTTGTTGCAATGATGAAGTAGCATTGTTAAAAATAA	180	MinL
121	TGATAAAGTTAGATTACAAAATTTGTTGCAATGATGAAGTAGCATTGTTAAAAATAA	180	MinFLC

181	CATGCTACTGATAAATTAATACATTTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAGTGATACATA	240	RSV_WT
181	CATGCTACTGATAAATTAATACATTTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAGTGATACATA	240	MinA
181	CATGCTACTGATAAATTAATACATTTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAGTGATACATA	240	MinB
181	CATGCTACTGATAAATTAATACATTTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAGTGATACATA	240	MinL
181	CATGCTACTGATAAATTAATACATTTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAGTGATACATA	240	MinFLC

241	CAATCAAATTAAGTGGCATTGTGTTTGTGCATGTTATTACAAGTAGTGATATTTGCCCTA	300	RSV_WT
241	CAATCAAATTAAGTGGCATTGTGTTTGTGCATGTTATTACAAGTAGTGATATTTGCCCTA	300	MinA
241	CAATCAAATTAAGTGGCATTGTGTTTGTGCATGTTATTACAAGTAGTGATATTTGCCCTA	300	MinB
241	CAATCAAATTAAGTGGCATTGTGTTTGTGCATGTTATTACAAGTAGTGATATTTGCCCTA	300	MinL
241	CAATCAAATTAAGTGGCATTGTGTTTGTGCATGTTATTACAAGTAGTGATATTTGCCCTA	300	MinFLC

301	ATAATAATATTGTAGTAAAATCCAATTTCAACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTT	360	RSV_WT
301	ATAATAATATTGTAGTAAAATCCAATTTCAACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTT	360	MinA
301	ATAATAATATTGTAGTAAAATCCAATTTCAACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTT	360	MinB
301	ATAATAATATTGTAGTAAAATCCAATTTCAACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTT	360	MinL
301	ATAATAATATTGTAGTAAAATCCAATTTCAACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTT	360	MinFLC

361	ATATATGGGAAATGATGGAATTAACACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACA	420	RSV_WT
361	ATATATGGGAAATGATGGAATTAACACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACA	420	MinA
361	ATATATGGGAAATGATGGAATTAACACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACA	420	MinB
361	ATATATGGGAAATGATGGAATTAACACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACA	420	MinL
361	ATATATGGGAAATGATGGAATTAACACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACA	420	MinFLC

421	ATTGTGAAATTAATTTCTCCAAAAAATAAGTGATTCACAAATGACCAATTTATATGAATC	480	RSV_WT
421	ATTGTGAAATTAATTTCTCCAAAAAATAAGTGATTCACAAATGACCAATTTATATGAATC	480	MinA
421	ATTGTGAAATTAATTTCTCCAAAAAATAAGTGATTCACAAATGACCAATTTATATGAATC	480	MinB
421	ATTGTGAAATTAATTTCTCCAAAAAATAAGTGATTCACAAATGACCAATTTATATGAATC	480	MinL
421	ATTGTGAAATTAATTTCTCCAAAAAATAAGTGATTCACAAATGACCAATTTATATGAATC	480	MinFLC

481	AATTATCTGAATTACTTGGATTTGATCTTAATCCATAAATTTAATTAATATCAACTAGC	540	RSV_WT
481	AATTATCTGAATTACTTGGATTTGATCTTAATCCATAAATTTAATTAATATCAACTAGC	540	MinA
481	AATTATCTGAATTACTTGGATTTGATCTTAATCCATAAATTTAATTAATATCAACTAGC	540	MinB
481	AATTATCTGAATTACTTGGATTTGATCTTAATCCATAAATTTAATTAATATCAACTAGC	540	MinL
481	AATTATCTGAATTACTTGGATTTGATCTTAATCCATAAATTTAATTAATATCAACTAGC	540	MinFLC

Figura 7

Figura 7 (cont.)

541	AAATCAATGTCACCTAACACCATTAGTTAATATAAACTTAAACAGAAGACAAAAATGGGGC	600	RSV_WT
541	AAATCAATGTCACCTAACACCATTAGTTAATATAAACTTAAACAGAAGACAAAAATGGGGC	600	MinA
541	AAATCAATGTCACCTAACACCATTAGTTAATATAAACTTAAACAGAAGACAAAAATGGGGC	600	MinB
541	AAATCAATGTCACCTAACACCATTAGTTAATATAAACTTAAACAGAAGACAAAAATGGGGC	600	MinL
541	AAATCAATGTCACCTAACACCATTAGTTAATATAAACTTAAACAGAAGACAAAAATGGGGC	600	MinFLC

601	AAATAAATCAATTCAGCCAAACCAACCATGGACCAACCCACAATGATAATACACCACAA	660	RSV_WT
601	AAATAAATCAATTCAGCCAAACCAACCATGGACCAACCCACAATGATAATACACCACAA	660	MinA
601	AAATAAATCAATTCAGCCAAACCAACCATGGACCAACCCACAATGATAATACACCACAA	660	MinB
601	AAATAAATCAATTCAGCCAAACCAACCATGGACCAACCCACAATGATAATACACCACAA	660	MinL
601	AAATAAATCAATTCAGCCAAACCAACCATGGACCAACCCACAATGATAATACACCACAA	660	MinFLC

661	AGACTGATGATCAGACAGATGAGACCGTTGTCACITGAGACCATAATAACATCCTAACC	720	RSV_WT
661	AGACTGATGATCAGACAGATGAGACCGTTGTCACITGAGACCATAATAACATCCTAACC	720	MinA
661	AGACTGATGATCAGACAGATGAGACCGTTGTCACITGAGACCATAATAACATCCTAACC	720	MinB
661	AGACTGATGATCAGACAGATGAGACCGTTGTCACITGAGACCATAATAACATCCTAACC	720	MinL
661	AGACTGATGATCAGACAGATGAGACCGTTGTCACITGAGACCATAATAACATCCTAACC	720	MinFLC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****			
721	AGAGACATCATAACACACAAAATTTATATACITGATAAATCATGAATGCATAGTGAGAAAA	780	RSV_WT
721	AGAGACATCATAACACACAAAATTTATATATCTGATTAATCAGGAATGCATCGTGAGAAAA	780	MinA
721	AGAGACATCATAACACACAAAATTTATATACITGATAAATCATGAATGCATAGTGAGAAAA	780	MinB
721	AGAGACATCATAACACACAAAATTTATATACITGATAAATCATGAATGCATAGTGAGAAAA	780	MinL
721	AGAGACATCATAACACACAAAATTTATATATCTGATTAATCAGGAATGCATCGTGAGAAAA	780	MinFLC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****			
781	CTTGATGAAAGACAGGCCACATTTACATTCCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACAC	840	RSV_WT
781	TTGGACGAAAGACAGGCCACATTTACATTCCTAGTCAATACGAAATGAAACTATTGCAT	840	MinA
781	CTTGATGAAAGACAGGCCACATTTACATTCCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACAC	840	MinB
781	CTTGATGAAAGACAGGCCACATTTACATTCCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACAC	840	MinL
781	TTGGACGAAAGACAGGCCACATTTACATTCCTAGTCAATACGAAATGAAACTATTGCAT	840	MinFLC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****			
841	AAAGTAGGAAGCACTAAATATAAAAAATATACTGAATACAACACAAAATATGGCACTTTC	900	RSV_WT
841	AAGGTAGGCTCAACTAAGTATANGAAATATACCGAATATAACACTAAATACGGAACTTTC	900	MinA
841	AAAGTAGGAAGCACTAAATATAAAAAATATACTGAATACAACACAAAATATGGCACTTTC	900	MinB
841	AAAGTAGGAAGCACTAAATATAAAAAATATACTGAATACAACACAAAATATGGCACTTTC	900	MinL
841	AAGGTAGGCTCAACTAAGTATANGAAATATACCGAATATAACACTAAATACGGAACTTTC	900	MinFLC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****			
901	CCTATGCCAATATTCATCAATCATGATGGGTTCTTAGAATGCATTTGGCATTAAAGCCTACA	960	RSV_WT
901	CCAAATGCCATATATTCATAAATCAGACGGGTTCTCGAATGCATAGGCATAAAACCTACA	960	MinA
901	CCTATGCCAATATTCATCAATCATGATGGGTTCTTAGAATGCATTTGGCATTAAAGCCTACA	960	MinB
901	CCTATGCCAATATTCATCAATCATGATGGGTTCTTAGAATGCATTTGGCATTAAAGCCTACA	960	MinL
901	CCAAATGCCATATATTCATAAATCAGACGGGTTCTCGAATGCATAGGCATAAAACCTACA	960	MinFLC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****			
961	ANGCATACTCCCATAATATACAAGTATGATCTCAATCCATAAATTTCAACACAAATATTCA	1020	RSV_WT
961	AAACATACACCCATAATCTATAAATACGATCTTAAACCCATAAATTTCAACACAAATATTCA	1020	MinA
961	ANGCATACTCCCATAATATACAAGTATGATCTCAATCCATAAATTTCAACACAAATATTCA	1020	MinB
961	ANGCATACTCCCATAATATACAAGTATGATCTCAATCCATAAATTTCAACACAAATATTCA	1020	MinL
961	AAACATACACCCATAATCTATAAATACGATCTTAAACCCATAAATTTCAACACAAATATTCA	1020	MinFLC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****			
1021	CACAATCTAAAACAACAACCTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTGAA	1080	RSV_WT
1021	CACAATCTAAAACAACAACCTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTGAA	1080	MinA
1021	CACAATCTAAAACAACAACCTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTGAA	1080	MinB
1021	CACAATCTAAAACAACAACCTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTGAA	1080	MinL
1021	CACAATCTAAAACAACAACCTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTGAA	1080	MinFLC

1081	AAITATAGTAATTTAAAACCTAAGGAGAGATATAGATAGAAAGATGGGGCAAATACAACC	1140	RSV_WT
1081	AAITATAGTAATTTAAAACCTAAGGAGAGATATAGATAGAAAGATGGGGCAAATACAACC	1140	MinA
1081	AAITATAGTAATTTAAAACCTAAGGAGAGATATAGATAGAAAGATGGGGCAAATACAACC	1140	MinB
1081	AAITATAGTAATTTAAAACCTAAGGAGAGATATAGATAGAAAGATGGGGCAAATACAACC	1140	MinL
1081	AAITATAGTAATTTAAAACCTAAGGAGAGATATAGATAGAAAGATGGGGCAAATACAACC	1140	MinFLC

Figura 7 (cont.)


```

2341 ATCATCATGGAAAAGTTTGCTCCTGAATTCATGGAGAAGATGCAAACACAGGGGCTACT 2400 RSV_WT
2341 ATCATCATGGAAAAGTTTGCTCCTGAATTCATGGAGAAGATGCAAACACAGGGGCTACT 2400 MinA
2341 ATCATCATGGAAAAGTTTGCTCCTGAATTCATGGAGAAGATGCAAACACAGGGGCTACT 2400 MinB
2341 ATCATCATGGAAAAGTTTGCTCCTGAATTCATGGAGAAGATGCAAACACAGGGGCTACT 2400 MinL
2341 ATCATCATGGAAAAGTTTGCTCCTGAATTCATGGAGAAGATGCAAACACAGGGGCTACT 2400 MinFLC
*****
2401 AAATTCCTAGAAATCAATAAAGGGCAAATTCACATCACCCAAAGATCCCAAGAAAAAAGAT 2460 RSV_WT
2401 AAATTCCTAGAAATCAATAAAGGGCAAATTCACATCACCCAAAGATCCCAAGAAAAAAGAT 2460 MinA
2401 AAATTCCTAGAAATCAATAAAGGGCAAATTCACATCACCCAAAGATCCCAAGAAAAAAGAT 2460 MinB
2401 AAATTCCTAGAAATCAATAAAGGGCAAATTCACATCACCCAAAGATCCCAAGAAAAAAGAT 2460 MinL
2401 AAATTCCTAGAAATCAATAAAGGGCAAATTCACATCACCCAAAGATCCCAAGAAAAAAGAT 2460 MinFLC
*****
2461 AGTATCATATCTGTCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCA 2520 RSV_WT
2461 AGTATCATATCTGTCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCT 2520 MinA
2461 AGTATCATATCTGTCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCA 2520 MinB
2461 AGTATCATATCTGTCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCA 2520 MinL
2461 AGTATCATATCTGTCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCT 2520 MinFLC
*****
2521 AATTCAACTATTATCAACCCAAACAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCCAAT 2580 RSV_WT
2521 AATTCAACTATTATCAACCCAAACAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCCAAT 2580 MinA
2521 AATTCAACTATTATCAACCCAAACAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCCAAT 2580 MinB
2521 AATTCAACTATTATCAACCCAAACAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCCAAT 2580 MinL
2521 AATTCAACTATTATCAACCCAAACAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCCAAT 2580 MinFLC
*****
2581 TATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTTCAAAGAAGACCCCTACACCAAGTGATAATCCCTTT 2640 RSV_WT
2581 TATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTTCAAAGAAGACCCCTACACCAAGTGATAATCCCTTT 2640 MinA
2581 TATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTTCAAAGAAGACCCCTACACCAAGTGATAATCCCTTT 2640 MinB
2581 TATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTTCAAAGAAGACCCCTACACCAAGTGATAATCCCTTT 2640 MinL
2581 TATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTTCAAAGAAGACCCCTACACCAAGTGATAATCCCTTT 2640 MinFLC
*****
2641 TCTAAACTATACAAAGAAACCATAGAAACATTTGATATCAATGAAGAAGATCCAGCTAT 2700 RSV_WT
2641 AGTAAATGTATAAAGGAAACCAATCGAAACATTCGATAAATACGAAGAAGATCATCATAC 2700 MinA
2641 TCTAAACTATACAAAGAAACCATAGAAACATTTGATATCAATGAAGAAGATCCAGCTAT 2700 MinB
2641 TCTAAACTATACAAAGAAACCATAGAAACATTTGATATCAATGAAGAAGATCCAGCTAT 2700 MinL
2641 AGTAAATGTATAAAGGAAACCAATCGAAACATTCGATAAATACGAAGAAGATCATCATAC 2700 MinFLC
*****
2701 TCATACGAAGAAATAAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATT 2760 RSV_WT
2701 TCATACGAAGAAATAAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATT 2760 MinA
2701 TCATACGAAGAAATAAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATT 2760 MinB
2701 TCATACGAAGAAATAAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATT 2760 MinL
2701 TCATACGAAGAAATAAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATT 2760 MinFLC
*****
2761 GATGAAAAATTAAGTGAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGA 2820 RSV_WT
2761 GATGAAAAATTAAGTGAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGA 2820 MinA
2761 GATGAAAAATTAAGTGAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGA 2820 MinB
2761 GATGAAAAATTAAGTGAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGA 2820 MinL
2761 GATGAAAAATTAAGTGAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGA 2820 MinFLC
*****
2821 CCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGATGCCATGGTTGGTTAAGAGAAGAAATGATA 2880 RSV_WT
2821 CCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGATGCCATGGTTGGTTAAGAGAAGAAATGATA 2880 MinA
2821 CCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGATGCCATGGTTGGTTAAGAGAAGAAATGATA 2880 MinB
2821 CCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGATGCCATGGTTGGTTAAGAGAAGAAATGATA 2880 MinL
2821 CCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGATGCCATGGTTGGTTAAGAGAAGAAATGATA 2880 MinFLC
*****
2881 GAAAAAATCAGAACTGAAGCATTAATGACCAATGACAGATTAGAAGCTATGGCAAGACTC 2940 RSV_WT
2881 GAAAAAATCAGAACTGAAGCATTAATGACCAATGACAGATTAGAAGCTATGGCAAGACTC 2940 MinA
2881 GAAAAAATCAGAACTGAAGCATTAATGACCAATGACAGATTAGAAGCTATGGCAAGACTC 2940 MinB
2881 GAAAAAATCAGAACTGAAGCATTAATGACCAATGACAGATTAGAAGCTATGGCAAGACTC 2940 MinL
2881 GAAAAAATCAGAACTGAAGCATTAATGACCAATGACAGATTAGAAGCTATGGCAAGACTC 2940 MinFLC
*****

```

Figura 7 (cont.)

ES 2 952 387 T3

```

4141 TTATCTGAAGTCCCASATCATCCCAAGTCATTGTTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGT 4200 RSV_WT
4141 TTATCTGAAGTCCCASATCATCCCAAGTCATTGTTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGT 4200 MinA
4141 TTATCTGAAGTCCCASATCATCCCAAGTCATTGTTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGT 4200 MinB
4141 TTATCTGAAGTCCCASATCATCCCAAGTCATTGTTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGT 4200 MinL
4141 TTATCTGAAGTCCCASATCATCCCAAGTCATTGTTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGT 4200 MinFLC
*****

4201 TAATAAAAAATATACACATGGGGCAAATAATCATTGGAGGAAATCCAACCTAATCACAATA 4260 RSV_WT
4201 TAATAAAAAATATACACATGGGGCAAATAATCATTGGAGGAAATCCAACCTAATCACAATA 4260 MinA
4201 TAATAAAAAATATACACATGGGGCAAATAATCATTGGAGGAAATCCAACCTAATCACAATA 4260 MinB
4201 TAATAAAAAATATACACATGGGGCAAATAATCATTGGAGGAAATCCAACCTAATCACAATA 4260 MinL
4201 TAATAAAAAATATACACATGGGGCAAATAATCATTGGAGGAAATCCAACCTAATCACAATA 4260 MinFLC
*****

4261 TCTGTTAACATAGACAAGTCCACACACCATACAGAATCAACCAATGGAAAAATACATCCAT 4320 RSV_WT
4261 TCTGTTAACATAGACAAGTCCACACACCATACAGAATCAACCAATGGAAAAATACATCCAT 4320 MinA
4261 TCTGTTAACATAGACAAGTCCACACACCATACAGAATCAACCAATGGAAAAATACATCCAT 4320 MinB
4261 TCTGTTAACATAGACAAGTCCACACACCATACAGAATCAACCAATGGAAAAATACATCCAT 4320 MinL
4261 TCTGTTAACATAGACAAGTCCACACACCATACAGAATCAACCAATGGAAAAATACATCCAT 4320 MinFLC
*****

4321 AACAAATAGAAATCTCAAGCAAATTTCTGGCCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAC 4380 RSV_WT
4321 AACAAATAGAAATCTCAAGCAAATTTCTGGCCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAC 4380 MinA
4321 AACAAATAGAAATCTCAAGCAAATTTCTGGCCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAC 4380 MinB
4321 AACAAATAGAAATCTCAAGCAAATTTCTGGCCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAC 4380 MinL
4321 AACAAATAGAAATCTCAAGCAAATTTCTGGCCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAC 4380 MinFLC
*****

4381 AATAATCTCTTTGCTAATCATAATCTCCATCATGATTGCAATACTAAACAAACTTTGTGA 4440 RSV_WT
4381 AATCATATCCCTATTAAATCATAATCTCAATTTATGATCGCAATCCTTAACAAACTATGTGA 4440 MinA
4381 AATAATCTCTTTGCTAATCATAATCTCCATCATGATTGCAATACTAAACAAACTTTGTGA 4440 MinB
4381 AATAATCTCTTTGCTAATCATAATCTCCATCATGATTGCAATACTAAACAAACTTTGTGA 4440 MinL
4381 AATCATATCCCTATTAAATCATAATCTCAATTTATGATCGCAATCCTTAACAAACTATGTGA 4440 MinFLC
***.***.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****

4441 ATATAACGTATTCATAAACAAACCTTTGAGTTACCAAGAGCTCGAGTTAATACTTGATA 4500 RSV_WT
4441 GTATAACGTATTCATAAACAAACCTTTGAGTTACCAAGAGCTCGAGTTAATACTTGATA 4500 MinA
4441 ATATAACGTATTCATAAACAAACCTTTGAGTTACCAAGAGCTCGAGTTAATACTTGATA 4500 MinB
4441 ATATAACGTATTCATAAACAAACCTTTGAGTTACCAAGAGCTCGAGTTAATACTTGATA 4500 MinL
4441 GTATAACGTATTCATAAACAAACCTTTGAGTTACCAAGAGCTCGAGTTAATACTTGATA 4500 MinFLC
.*****.***.***.*****.***.*****.***.*****.***.*****

4501 AAGTAGTTAATTAATAATAGTCATAACCAATGAACTAGGATATCAAGACTAACCAATAACAT 4560 RSV_WT
4501 AAGTAGTTAATTAATAATAGTCATAACCAATGAACTAGGATATCAAGACTAACCAATAACAT 4560 MinA
4501 AAGTAGTTAATTAATAATAGTCATAACCAATGAACTAGGATATCAAGACTAACCAATAACAT 4560 MinB
4501 AAGTAGTTAATTAATAATAGTCATAACCAATGAACTAGGATATCAAGACTAACCAATAACAT 4560 MinL
4501 AAGTAGTTAATTAATAATAGTCATAACCAATGAACTAGGATATCAAGACTAACCAATAACAT 4560 MinFLC
*****

4561 TGGGGCAAATGCAAAACATGTCCAAAAACAAGGACCAACGCAACCGCTAAGACATTAGAAAG 4620 RSV_WT
4561 TGGGGCAAATGCAAAACATGTCCAAAAACAAGGACCAACGCAACCGCTAAGACATTAGAAAG 4620 MinA
4561 TGGGGCAAATGCAAAACATGTCCAAAAACAAGGACCAACGCAACCGCTAAGACATTAGAAAG 4620 MinB
4561 TGGGGCAAATGCAAAACATGTCCAAAAACAAGGACCAACGCAACCGCTAAGACATTAGAAAG 4620 MinL
4561 TGGGGCAAATGCAAAACATGTCCAAAAACAAGGACCAACGCAACCGCTAAGACATTAGAAAG 4620 MinFLC
*****.***.***.*****

4621 GACCTGGGACACTCTCAATCATTTATTATTATATCATATCATCGTGCCTTATATAAGTTAAATCT 4680 RSV_WT
4621 GACCTGGGACACTCTCAATCATTTATTATTATATCATATCATCGTGCCTTATATAAGTTAAATCT 4680 MinA
4621 GACATGGGATACCTTAAATCACCTATTATTATCATAAGCTCATGCTTATATAAATTGAACCT 4680 MinB
4621 GACCTGGGACACTCTCAATCATTTATTATTATATCATATCATCGTGCCTTATATAAGTTAAATCT 4680 MinL
4621 GACATGGGATACCTTAAATCACCTATTATTATCATAAGCTCATGCTTATATAAATTGAACCT 4680 MinFLC
***.*****.***.***.*****.*****.***.*****.***.*****.***.***

4681 TAAATCTGTAGCACAAATCACATTATCCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACCTTAT 4740 RSV_WT
4681 TAAATCTGTAGCACAAATCACATTATCCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACCTTAT 4740 MinA
4681 TAAATCCGTGACACAGATAACCTTATCAATCTCGCAATGATAATCTCAACAAGCTTAAAT 4740 MinB
4681 TAAATCTGTAGCACAAATCACATTATCCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACCTTAT 4740 MinL
4681 TAAATCCGTGACACAGATAACCTTATCAATCTCGCAATGATAATCTCAACAAGCTTAAAT 4740 MinFLC
*****.***.*****.***.***.*****.*****.***.*****.***.***

```

Figura 7 (cont.)

4741	AATTGCAGCCATCATATTCATAGCCTCGGCAAACCACAAAGTCACACCCAACTGCAAT	4800	RSV WT
4741	AATTGCAGCCATCATATTCATAGCCTCGGCAAACCACAAAGTCACACCCAACTGCAAT	4800	MinA
4741	CATAGCCGCAATAATCTTTATCGCTAGCGCTAACCCATAAGGTAAACCCAAACCGCAAT	4800	MinB
4741	AATTGCAGCCATCATATTCATAGCCTCGGCAAACCACAAAGTCACACCCAACTGCAAT	4800	MinL
4741	CATAGCCGCAATAATCTTTATCGCTAGCGCTAACCCATAAGGTAAACCCAAACCGCAAT	4800	MinFLC
<p>*,**,* ** ** ** **</p>			
4801	CATCAAGATGCACCAAGCCAGATCAAGAACCAACCCCAACATACCTCACCCAGAAATCC	4860	RSV WT
4801	CATCAAGATGCACCAAGCCAGATCAAGAACCAACCCCAACATACCTCACCCAGAAATCC	4860	MinA
4801	TATACAGGACGCAACATCCCAATCAAAAACACAAACCCCAACATACCTAACCCAAACCC	4860	MinB
4801	CATCAAGATGCACCAAGCCAGATCAAGAACCAACCCCAACATACCTCACCCAGAAATCC	4860	MinL
4801	TATACAGGACGCAACATCCCAATCAAAAACACAAACCCCAACATACCTAACCCAAACCC	4860	MinFLC
<p>***** ** ** **</p>			
4861	TCAGCTTGGAAATCAGTCCCTCTAATCCGCTGAAATTACATCACAATCACCCACATACT	4920	RSV WT
4861	TCAGCTTGGAAATCAGTCCCTCTAATCCGCTGAAATTACATCACAATCACCCACATACT	4920	MinA
4861	ACAAC7CGGAATCTCACCCTCTAACCCTACCGAAATACCTCACAGATTACAACGATACT	4920	MinB
4861	TCAGCTTGGAAATCAGTCCCTCTAATCCGCTGAAATTACATCACAATCACCCACATACT	4920	MinL
4861	ACAAC7CGGAATCTCACCCTCTAACCCTACCGAAATACCTCACAGATTACAACGATACT	4920	MinFLC
<p>*,**,* ** ** **</p>			
4921	AGCTTCAACAACACCCGGAGTCAAGTCAACCCCTGCATCCACAACAGTCAAGACCAAAA	4980	RSV WT
4921	AGCTTCAACAACACCCGGAGTCAAGTCAACCCCTGCATCCACAACAGTCAAGACCAAAA	4980	MinA
4921	CGCAAGTACAACCCCGGAGTCAATCGACACTCCATCGCAACCCGTAAGACTAAGAA	4980	MinB
4921	AGCTTCAACAACACCCGGAGTCAAGTCAACCCCTGCATCCACAACAGTCAAGACCAAAA	4980	MinL
4921	CGCAAGTACAACCCCGGAGTCAATCGACACTCCATCGCAACCCGTAAGACTAAGAA	4980	MinFLC
<p>*,**,* ** ** **</p>			
4981	CACAACAACAACCTCAACACAAACCCAGCAAGCCACCACAAAACACCGCCAAAACAAC	5040	RSV WT
4981	CACAACAACAACCTCAACACAAACCCAGCAAGCCACCACAAAACACCGCCAAAACAAC	5040	MinA
4981	TACAACAACAACCCCAACCCCAACCTAGTAAAGCTACAACTAAGCAACCGCCAAAACAAC	5040	MinB
4981	CACAACAACAACCTCAACACAAACCCAGCAAGCCACCACAAAACACCGCCAAAACAAC	5040	MinL
4981	TACAACAACAACCCCAACCCCAACCTAGTAAAGCTACAACTAAGCAACCGCCAAAACAAC	5040	MinFLC
<p>***** ** ** **</p>			
5041	ACCAAGCAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTCAACTTTGTACCCCTGCAGCAT	5100	RSV WT
5041	ACCAAGCAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTCAACTTTGTACCCCTGCAGCAT	5100	MinA
5041	TCCTCTAAACCGAATAACGATTTTCACTTGAAGTGTCAACTTTGTACCCCTGCAGCAT	5100	MinB
5041	ACCAAGCAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTCAACTTTGTACCCCTGCAGCAT	5100	MinL
5041	TCCTCTAAACCGAATAACGATTTTCACTTGAAGTGTCAACTTTGTACCCCTGCAGCAT	5100	MinFLC
<p>*,**,* ** ** **</p>			
5101	ATGCAGCAACAATCCACCTGCTGGGCTATCTGCAAAGAAATACCAAACAAAAACCCAGG	5160	RSV WT
5101	ATGCAGCAACAATCCACCTGCTGGGCTATCTGCAAAGAAATACCAAACAAAAACCCAGG	5160	MinA
5101	TTGCTCTAATAACCCACATGCTGGGCCATATGCAAAACGCATCCCAAACAGAAACCCGG	5160	MinB
5101	ATGCAGCAACAATCCACCTGCTGGGCTATCTGCAAAGAAATACCAAACAAAAACCCAGG	5160	MinL
5101	TTGCTCTAATAACCCACATGCTGGGCCATATGCAAAACGCATCCCAAACAGAAACCCGG	5160	MinFLC
<p>*,**,* ** ** **</p>			
5161	AAGAAAACCACTACCAAGCCCAAAAAACCAACCCCTCAAGACAACCAAAAAGATCC	5220	RSV WT
5161	AAGAAAACCACTACCAAGCCCAAAAAACCAACCCCTCAAGACAACCAAAAAGATCC	5220	MinA
5161	AAGAAAACAACCCACTAAGCCCAAAAGAAACCAACCCCTAAGACAACCAAAAAGATCC	5220	MinB
5161	AAGAAAACCACTACCAAGCCCAAAAAACCAACCCCTCAAGACAACCAAAAAGATCC	5220	MinL
5161	AAGAAAACAACCCACTAAGCCCAAAAGAAACCAACCCCTAAGACAACCAAAAAGATCC	5220	MinFLC
<p>***** ** ** **</p>			
5221	CBAACCTCAAACCACTAATCAAAGGAAGTACCACCCCAAGCCCAAGAAAGGCCAAC	5280	RSV WT
5221	CBAACCTCAAACCACTAATCAAAGGAAGTACCACCCCAAGCCCAAGAAAGGCCAAC	5280	MinA
5221	AAAACCCCAACCAACTAAGTCTAAAGAGGTCCCAACCACTAAGCCAAACGAAAGGCCAAC	5280	MinB
5221	CBAACCTCAAACCACTAATCAAAGGAAGTACCACCCCAAGCCCAAGAAAGGCCAAC	5280	MinL
5221	AAAACCCCAACCAACTAAGTCTAAAGAGGTCCCAACCACTAAGCCAAACGAAAGGCCAAC	5280	MinFLC
<p>***** ** ** **</p>			
5281	CATCAACCCCAAAAAACAACATCATAACTACTACTCACCTCCAACCCCAAGGAAA	5340	RSV WT
5281	CATCAACCCCAAAAAACAACATCATAACTACTACTCACCTCCAACCCCAAGGAAA	5340	MinA
5281	AATCAATACAACTAAGACTAATATAATCACACCTTACTGACATCTAACACAACCGGAAA	5340	MinB
5281	CATCAACCCCAAAAAACAACATCATAACTACTACTCACCTCCAACCCCAAGGAAA	5340	MinL
5281	AATCAATACAACTAAGACTAATATAATCACACCTTACTGACATCTAACACAACCGGAAA	5340	MinFLC
<p>***** ** ** **</p>			

Figura 7 (cont.)

7141	TTATAGTGATTATAGTAATATTGTTATCATTAAATGCTGGTGGACTGCTCTTATACTGTA	7200	RSV_WT
7141	TTATAGTGATTATAGTAATATTGTTATCATTAAATGCTGGTGGACTGCTCTTATACTGTA	7200	MinA
7141	TAATCGTTATAATCGTTAATCTGTTAAGCTTAATCGCAGTCCGATTACTGTTATATTGTA	7200	MinB
7141	TTATAGTGATTATAGTAATATTGTTATCATTAAATGCTGGTGGACTGCTCTTATACTGTA	7200	MinL
7141	TAATCGTTATAATCGTTAATCTGTTAAGCTTAATCGCAGTCCGATTACTGTTATATTGTA	7200	MinFLC
	*:**:		
7201	AGGCCGAAAGCACACCAGTCCACACTAAGCAAAGATCAACTGAGTGGTATAAATAATATTG	7260	RSV_WT
7201	AGGCCGAAAGCACACCAGTCCACACTAAGCAAAGATCAACTGAGTGGTATAAATAATATTG	7260	MinA
7201	AAGCTAGATCAACACCCTAACACTATCTAAAGACCAATTATCCGGTATAAATAATATTG	7260	MinB
7201	AGGCCGAAAGCACACCAGTCCACACTAAGCAAAGATCAACTGAGTGGTATAAATAATATTG	7260	MinL
7201	AAGCTAGATCAACACCCTAACACTATCTAAAGACCAATTATCCGGTATAAATAATATTG	7260	MinFLC
	..*.*.*:**:		
7261	CATTAGTAACTAAATAAAAATAGCACCTAATCATGTTCTTACAATGGTTACTATCTGC	7320	RSV_WT
7261	CATTAGTAACTAAATAAAAATAGCACCTAATCATGTTCTTACAATGGTTACTATCTGC	7320	MinA
7261	CATTCTCAAACCTAAATAAAAATAGCACCTAATCATGTTCTTACAATGGTTACTATCTGC	7320	MinB
7261	CATTAGTAACTAAATAAAAATAGCACCTAATCATGTTCTTACAATGGTTACTATCTGC	7320	MinL
7261	CATTCTCAAACCTAAATAAAAATAGCACCTAATCATGTTCTTACAATGGTTACTATCTGC	7320	MinFLC
	*****:**:		
7321	TCATAGACAACCCATCTGTCAATGGATTTCTTAAAATCTGAACTTCATCGAAACCTCA	7380	RSV_WT
7321	TCATAGACAACCCATCTGTCAATGGATTTCTTAAAATCTGAACTTCATCGAAACCTCA	7380	MinA
7321	TCATAGACAACCCATCTGTCAATGGATTTCTTAAAATCTGAACTTCATCGAAACCTCA	7380	MinB
7321	TCATAGACAACCCATCTGTCAATGGATTTCTTAAAATCTGAACTTCATCGAAACCTCA	7380	MinL
7321	TCATAGACAACCCATCTGTCAATGGATTTCTTAAAATCTGAACTTCATCGAAACCTCA	7380	MinFLC
	*****:		
7381	TCTATAAACCATCTCACTTACACTATTTAAGTAGATTCTAGTTTATAGTTATATAAAAC	7440	RSV_WT
7381	TCTATAAACCATCTCACTTACACTATTTAAGTAGATTCTAGTTTATAGTTATATAAAAC	7440	MinA
7381	TCTATAAACCATCTCACTTACACTATTTAAGTAGATTCTAGTTTATAGTTATATAAAAC	7440	MinB
7381	TCTATAAACCATCTCACTTACACTATTTAAGTAGATTCTAGTTTATAGTTATATAAAAC	7440	MinL
7381	TCTATAAACCATCTCACTTACACTATTTAAGTAGATTCTAGTTTATAGTTATATAAAAC	7440	MinFLC
	*****:		
7441	ACAATTGCATGCCAGATTAACCTACCATCTGTAAAATGAAAACCTGGGGCAAATATGTCA	7500	RSV_WT
7441	ACAATTGCATGCCAGATTAACCTACCATCTGTAAAATGAAAACCTGGGGCAAATATGTCA	7500	MinA
7441	ACAATTGCATGCCAGATTAACCTACCATCTGTAAAATGAAAACCTGGGGCAAATATGTCA	7500	MinB
7441	ACAATTGCATGCCAGATTAACCTACCATCTGTAAAATGAAAACCTGGGGCAAATATGTCA	7500	MinL
7441	ACAATTGCATGCCAGATTAACCTACCATCTGTAAAATGAAAACCTGGGGCAAATATGTCA	7500	MinFLC
	*****:		
7501	CGAAGGAATCCTTGCAAATTTGAAATTCGAGGTCATTGCTTAAATGGTAAGAGGTGTCA	7560	RSV_WT
7501	CGAAGGAATCCTTGCAAATTTGAAATTCGAGGTCATTGCTTAAATGGTAAGAGGTGTCA	7560	MinA
7501	CGAAGGAATCCTTGCAAATTTGAAATTCGAGGTCATTGCTTAAATGGTAAGAGGTGTCA	7560	MinB
7501	CGAAGGAATCCTTGCAAATTTGAAATTCGAGGTCATTGCTTAAATGGTAAGAGGTGTCA	7560	MinL
7501	CGAAGGAATCCTTGCAAATTTGAAATTCGAGGTCATTGCTTAAATGGTAAGAGGTGTCA	7560	MinFLC
	*****:		
7561	TTTAGTCATAAATTATTTGAATGSCCACCOCATGCCTGCTTGAAGACAAAACCTTTATG	7620	RSV_WT
7561	TTTAGTCATAAATTATTTGAATGSCCACCOCATGCCTGCTTGAAGACAAAACCTTTATG	7620	MinA
7561	TTTAGTCATAAATTATTTGAATGSCCACCOCATGCCTGCTTGAAGACAAAACCTTTATG	7620	MinB
7561	TTTAGTCATAAATTATTTGAATGSCCACCOCATGCCTGCTTGAAGACAAAACCTTTATG	7620	MinL
7561	TTTAGTCATAAATTATTTGAATGSCCACCOCATGCCTGCTTGAAGACAAAACCTTTATG	7620	MinFLC
	*****:		
7621	TTAAACAGAATACTTAAAGTCTATGGATAAAAAGTATAGATAACCTTATCAGAAAATAAGTGA	7680	RSV_WT
7621	TTAAACAGAATACTTAAAGTCTATGGATAAAAAGTATAGATAACCTTATCAGAAAATAAGTGA	7680	MinA
7621	TTAAACAGAATACTTAAAGTCTATGGATAAAAAGTATAGATAACCTTATCAGAAAATAAGTGA	7680	MinB
7621	TTAAACAGAATACTTAAAGTCTATGGATAAAAAGTATAGATAACCTTATCAGAAAATAAGTGA	7680	MinL
7621	TTAAACAGAATACTTAAAGTCTATGGATAAAAAGTATAGATAACCTTATCAGAAAATAAGTGA	7680	MinFLC
	*****:		
7681	GCTGCAGAGTTGGACAGAACAGAGAGTATGCTCTTGGTGTAGTTGGAGTGTAGAGAGT	7740	RSV_WT
7681	GCTGCAGAGTTGGACAGAACAGAGAGTATGCTCTTGGTGTAGTTGGAGTGTAGAGAGT	7740	MinA
7681	GCTGCAGAGTTGGACAGAACAGAGAGTATGCTCTTGGTGTAGTTGGAGTGTAGAGAGT	7740	MinB
7681	GCTGCAGAGTTGGACAGAACAGAGAGTATGCTCTTGGTGTAGTTGGAGTGTAGAGAGT	7740	MinL
7681	GCTGCAGAGTTGGACAGAACAGAGAGTATGCTCTTGGTGTAGTTGGAGTGTAGAGAGT	7740	MinFLC
	*****:		

Figura 7 (cont.)

```

7741 TATATAGGATCAATAAACCAATATAACTAAACAATCAGCATGTGTTGCCATGAGCAAACCTC 7800 RSV_WT
7741 TATATAGGATCAATAAACCAATATAACTAAACAATCAGCATGTGTTGCCATGAGCAAACCTC 7800 MinA
7741 TATATAGGATCAATAAACCAATATAACTAAACAATCAGCATGTGTTGCCATGAGCAAACCTC 7800 MinB
7741 TATATAGGATCAATAAACCAATATAACTAAACAATCAGCATGTGTTGCCATGAGCAAACCTC 7800 MinL
7741 TATATAGGATCAATAAACCAATATAACTAAACAATCAGCATGTGTTGCCATGAGCAAACCTC 7800 MinFLC
*****

7801 CTCCTGAACTCAATAGTGTATATCAAAAAGCTGAGGGACAATGAAGAGCTAAATTCA 7860 RSV_WT
7801 CTCCTGAACTCAATAGTGTATATCAAAAAGCTGAGGGACAATGAAGAGCTAAATTCA 7860 MinA
7801 CTCCTGAACTCAATAGTGTATATCAAAAAGCTGAGGGACAATGAAGAGCTAAATTCA 7860 MinB
7801 CTCCTGAACTCAATAGTGTATATCAAAAAGCTGAGGGACAATGAAGAGCTAAATTCA 7860 MinL
7801 CTCCTGAACTCAATAGTGTATATCAAAAAGCTGAGGGACAATGAAGAGCTAAATTCA 7860 MinFLC
*****

7861 CCCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCTATATCATATATTGAAGCAACAGGAAAAACAAT 7920 RSV_WT
7861 CCCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCTATATCATATATTGAAGCAACAGGAAAAACAAT 7920 MinA
7861 CCCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCTATATCATATATTGAAGCAACAGGAAAAACAAT 7920 MinB
7861 CCCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCTATATCATATATTGAAGCAACAGGAAAAACAAT 7920 MinL
7861 CCCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCTATATCATATATTGAAGCAACAGGAAAAACAAT 7920 MinFLC
*****

7921 AAACAAACTATCCATCTGTTAAAAAGATTGCCAGCAGACGTATTGAAGAAAACCATCAA 7980 RSV_WT
7921 AAACAAACTATCCATCTGTTAAAAAGATTGCCAGCAGACGTATTGAAGAAAACCATCAA 7980 MinA
7921 AAACAAACTATCCATCTGTTAAAAAGATTGCCAGCAGACGTATTGAAGAAAACCATCAA 7980 MinB
7921 AAACAAACTATCCATCTGTTAAAAAGATTGCCAGCAGACGTATTGAAGAAAACCATCAA 7980 MinL
7921 AAACAAACTATCCATCTGTTAAAAAGATTGCCAGCAGACGTATTGAAGAAAACCATCAA 7980 MinFLC
*****

7981 AACACATTGGATATCCATAAGAGCATRACCATCAACRACCCAAAAGARTCAACTGTTAGT 8040 RSV_WT
7981 AACACATTGGATATCCATAAGAGCATRACCATCAACRACCCAAAAGARTCAACTGTTAGT 8040 MinA
7981 AACACATTGGATATCCATAAGAGCATRACCATCAACRACCCAAAAGARTCAACTGTTAGT 8040 MinB
7981 AACACATTGGATATCCATAAGAGCATRACCATCAACRACCCAAAAGARTCAACTGTTAGT 8040 MinL
7981 AACACATTGGATATCCATAAGAGCATRACCATCAACRACCCAAAAGARTCAACTGTTAGT 8040 MinFLC
*****

8041 GATACAAATGACCATGCCAAAAATAATGATACTACCTGACAAATATCCTTGTAGTATAAC 8100 RSV_WT
8041 GATACAAATGACCATGCCAAAAATAATGATACTACCTGACAAATATCCTTGTAGTATAAC 8100 MinA
8041 GATACAAATGACCATGCCAAAAATAATGATACTACCTGACAAATATCCTTGTAGTATAAC 8100 MinB
8041 GATACAAATGACCATGCCAAAAATAATGATACTACCTGACAAATATCCTTGTAGTATAAC 8100 MinL
8041 GATACAAATGACCATGCCAAAAATAATGATACTACCTGACAAATATCCTTGTAGTATAAC 8100 MinFLC
*****

8101 TTCCATACTAATAACAAGTAGATGTAGAGTTACTATGTATAATCAAAGAACACACTATA 8160 RSV_WT
8101 TTCCATACTAATAACAAGTAGATGTAGAGTTACTATGTATAATCAAAGAACACACTATA 8160 MinA
8101 TTCCATACTAATAACAAGTAGATGTAGAGTTACTATGTATAATCAAAGAACACACTATA 8160 MinB
8101 TTCCATACTAATAACAAGTAGATGTAGAGTTACTATGTATAATCAAAGAACACACTATA 8160 MinL
8101 TTCCATACTAATAACAAGTAGATGTAGAGTTACTATGTATAATCAAAGAACACACTATA 8160 MinFLC
*****

8161 TTTCAATCAAACAACCCAAATAACCATATGTACTCACCGAATCAAACATTCATGAAAT 8220 RSV_WT
8161 TTTCAATCAAACAACCCAAATAACCATATGTACTCACCGAATCAAACATTCATGAAAT 8220 MinA
8161 TTTCAATCAAACAACCCAAATAACCATATGTACTCACCGAATCAAACATTCATGAAAT 8220 MinB
8161 TTTCAATCAAACAACCCAAATAACCATATGTACTCACCGAATCAAACATTCATGAAAT 8220 MinL
8161 TTTCAATCAAACAACCCAAATAACCATATGTACTCACCGAATCAAACATTCATGAAAT 8220 MinFLC
*****

8221 CCATTGGACCTCTCAAGAATTGATGTACACAATTCAAAATTTTCTACACATCTAGGTAT 8280 RSV_WT
8221 CCATTGGACCTCTCAAGAATTGATGTACACAATTCAAAATTTTCTACACATCTAGGTAT 8280 MinA
8221 CCATTGGACCTCTCAAGAATTGATGTACACAATTCAAAATTTTCTACACATCTAGGTAT 8280 MinB
8221 CCATTGGACCTCTCAAGAATTGATGTACACAATTCAAAATTTTCTACACATCTAGGTAT 8280 MinL
8221 CCATTGGACCTCTCAAGAATTGATGTACACAATTCAAAATTTTCTACACATCTAGGTAT 8280 MinFLC
*****

8281 TATTGAGGATATATACAAATATATATATTAGTGTACATAACACTCAATTCTAACACTCAC 8340 RSV_WT
8281 TATTGAGGATATATACAAATATATATATTAGTGTACATAACACTCAATTCTAACACTCAC 8340 MinA
8281 TATTGAGGATATATACAAATATATATATTAGTGTACATAACACTCAATTCTAACACTCAC 8340 MinB
8281 TATTGAGGATATATACAAATATATATATTAGTGTACATAACACTCAATTCTAACACTCAC 8340 MinL
8281 TATTGAGGATATATACAAATATATATATTAGTGTACATAACACTCAATTCTAACACTCAC 8340 MinFLC
*****

```

Figura 7 (cont.)

```

8341 CACATCGTTACATTATTAATTCAAAACAAATTCAGTTGTGGGACAAAATGGATCCCATTAT 8400 RSV_WT
8341 CACATCGTTACATTATTAATTCAAAACAAATTCAGTTGTGGGACAAAATGGATCCCATTAT 8400 MinA
8341 CACATCGTTACATTATTAATTCAAAACAAATTCAGTTGTGGGACAAAATGGATCCCATTAT 8400 MinB
8341 CACATCGTTACATTATTAATTCAAAACAAATTCAGTTGTGGGACAAAATGGATCCCATTAT 8400 MinL
8341 CACATCGTTACATTATTAATTCAAAACAAATTCAGTTGTGGGACAAAATGGATCCCATTAT 8400 MinFLC
*****

8401 TAATGGAAATTCGCTAATGTTTATCTAACCGATAGTTATTTAAAAGGTGTTATCTCTTT 8460 RSV_WT
8401 TAATGGAAATTCGCTAATGTTTATCTAACCGATAGTTATTTAAAAGGTGTTATCTCTTT 8460 MinA
8401 TAATGGAAATTCGCTAATGTTTATCTAACCGATAGTTATTTAAAAGGTGTTATCTCTTT 8460 MinB
8401 TAATGGAAATTCGCTAATGTTTATCTAACCGATAGTTATTTAAAAGGTGTTATCTCTTT 8460 MinL
8401 TAATGGAAATTCGCTAATGTTTATCTAACCGATAGTTATTTAAAAGGTGTTATCTCTTT 8460 MinFLC
*****

8461 CTCAGAGTGTAAATGCTTTAGGAAGTTACATATTCATGGTCCCTTATCTCAAAAATGATTA 8520 RSV_WT
8461 CTCAGAGTGTAAATGCTTTAGGAAGTTACATATTCATGGTCCCTTATCTCAAAAATGATTA 8520 MinA
8461 CTCAGAGTGTAAATGCTTTAGGAAGTTACATATTCATGGTCCCTTATCTCAAAAATGATTA 8520 MinB
8461 TAGCGAATGTACCGCATTAGGGTCATATATCTTTAACGGTCCATATCTTAAAAACGATTA 8520 MinL
8461 TAGCGAATGTACCGCATTAGGGTCATATATCTTTAACGGTCCATATCTTAAAAACGATTA 8520 MinFLC
: .*.***** :*.***** :*.***** :*.***** :*.***** :*.*****

8521 TACCAACTTAATAGTAGACAAAATCCATTAAATAGAACACATGAATCTAAGAAACTAAA 8580 RSV_WT
8521 TACCAACTTAATAGTAGACAAAATCCATTAAATAGAACACATGAATCTAAGAAACTAAA 8580 MinA
8521 TACCAACTTAATAGTAGACAAAATCCATTAAATAGAACACATGAATCTAAGAAACTAAA 8580 MinB
8521 TACTAATCTAATCAGTAGACAAAATCCGTTAATCGAACATATGAATCTTAAAGAACTGAA 8580 MinL
8521 TACTAATCTAATCAGTAGACAAAATCCGTTAATCGAACATATGAATCTTAAAGAACTGAA 8580 MinFLC
*** ** **** *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***

8581 TATAACACAGTCCCTTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAATAAAATTAGAAGAACCTAC 8640 RSV_WT
8581 TATAACACAGTCCCTTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAATAAAATTAGAAGAACCTAC 8640 MinA
8581 TATAACACAGTCCCTTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAATAAAATTAGAAGAACCTAC 8640 MinB
8581 TATCACACAAATCTTTGATCAGTAAGTATCATAAAGGCGAAATCAAACTCGAAGAACCTAC 8640 MinL
8581 TATCACACAAATCTTTGATCAGTAAGTATCATAAAGGCGAAATCAAACTCGAAGAACCTAC 8640 MinFLC
***.*****.*** **.*. : *****.*****.*****.*** **.*.*****

8641 TTATTTTCAGTCATTACTTATGACATACAAGAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTAC 8700 RSV_WT
8641 TTATTTTCAGTCATTACTTATGACATACAAGAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTAC 8700 MinA
8641 TTATTTTCAGTCATTACTTATGACATACAAGAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTAC 8700 MinB
8641 ATATTTTCAATCACTATTAATGACATATAAGTCTATGACATCTAGCGAACAGATCGCTAC 8700 MinL
8641 ATATTTTCAATCACTATTAATGACATATAAGTCTATGACATCTAGCGAACAGATCGCTAC 8700 MinFLC
:*****.*** **.*.*****.*** :*****.*** :*****.*** :*****.***

8701 CACTAATTTACTTAAAAGATAAATAGAAGAGCTATAGAAAATAGTGATGTCAAAAGTCTA 8760 RSV_WT
8701 CACTAATTTACTTAAAAGATAAATAGAAGAGCTATAGAAAATAGTGATGTCAAAAGTCTA 8760 MinA
8701 CACTAATTTACTTAAAAGATAAATAGAAGAGCTATAGAAAATAGTGATGTCAAAAGTCTA 8760 MinB
8701 TACTAATCTGTTGAAGAAAATTAATAGACGAGCTATAGAGATATCTGACGTTAAGGTATA 8760 MinL
8701 TACTAATCTGTTGAAGAAAATTAATAGACGAGCTATAGAGATATCTGACGTTAAGGTATA 8760 MinFLC
***** * . * **.*.***:***.*****.*** :*** **.*.***

8761 TGCTATATTGAATAAACTAGGGCTTAAAGAAAAGGACAAAGATTAATCCACAACTGGACA 8820 RSV_WT
8761 TGCTATATTGAATAAACTAGGGCTTAAAGAAAAGGACAAAGATTAATCCACAACTGGACA 8820 MinA
8761 TGCTATATTGAATAAACTAGGGCTTAAAGAAAAGGACAAAGATTAATCCACAACTGGACA 8820 MinB
8761 CGCTATACTGAATAAATGGGGTTAAAGAGGAAAGATAAGATAAATCTAATACCGGTCA 8820 MinL
8761 CGCTATACTGAATAAATGGGGTTAAAGAGGAAAGATAAGATAAATCTAATACCGGTCA 8820 MinFLC
***** ***** *.* **.*.*****.*** **.*.*****.***** ** **.*.***

8821 AGATGAAGACAACTCAGTTATTACGACCATAATCAAGATGATATACITTCAGCTGTTAA 8880 RSV_WT
8821 AGATGAAGACAACTCAGTTATTACGACCATAATCAAGATGATATACITTCAGCTGTTAA 8880 MinA
8821 AGATGAAGACAACTCAGTTATTACGACCATAATCAAGATGATATACITTCAGCTGTTAA 8880 MinB
8821 AGACGAAGATAAATAGTGAATTAATACACAAATTAATTAAGACGATATACITTCAGCTGTTAA 8880 MinL
8821 AGACGAAGATAAATAGTGAATTAATACACAAATTAATTAAGACGATATACITTCAGCTGTTAA 8880 MinFLC
*** ***** ** :*.***** **.*:** *****.*****.***.*** **

8881 AGATAATCAATCTCATCTTAAAGCAGACAAAATCACTCTACAAAACAAAAGACACAAAT 8940 RSV_WT
8881 AGATAATCAATCTCATCTTAAAGCAGACAAAATCACTCTACAAAACAAAAGACACAAAT 8940 MinA
8881 AGATAATCAATCTCATCTTAAAGCAGACAAAATCACTCTACAAAACAAAAGACACAAAT 8940 MinB
8881 GGATAATCAATCACATCTTAAAGCCGATAAAAATCATAGTACTAARACAAAAGATACAAAT 8940 MinL
8881 GGATAATCAATCACATCTTAAAGCCGATAAAAATCATAGTACTAARACAAAAGATACAAAT 8940 MinFLC
*****.*****.*****.*** ***** :***.*****.***** *****

```

Figura 7 (cont.)

```

8941 CAAAACAACACTCTTGAAGAAATGATGTGTTCAATGCAACATCCTCCATCATGGTTAAT 9000 RSV_WT
8941 CAAAACAACACTCTTGAAGAAATGATGTGTTCAATGCAACATCCTCCATCATGGTTAAT 9000 MinA
8941 CAAAACAACACTCTTGAAGAAATGATGTGTTCAATGCAACATCCTCCATCATGGTTAAT 9000 MinB
8941 TAAAACACTACATTGTTAAAGAAATGATGTGTTCTATGCAACATCCACCTAGTTGGTTAAT 9000 MinL
8941 TAAAACACTACATTGTTAAAGAAATGATGTGTTCTATGCAACATCCACCTAGTTGGTTAAT 9000 MinFLC
*****

9001 ACATTGGTTAACTTATACACAAAATTAACCAACATATTAACACAGTATCGATCRAATGA 9060 RSV_WT
9001 ACATTGGTTAACTTATACACAAAATTAACCAACATATTAACACAGTATCGATCRAATGA 9060 MinA
9001 ACATTGGTTAACTTATACACAAAATTAACCAACATATTAACACAGTATCGATCRAATGA 9060 MinB
9001 ACATTGGTTAACTTATACACTAAGTTGAACAATATACCTTACACAATATCGATCRAACGA 9060 MinL
9001 ACATTGGTTAACTTATACACTAAGTTGAACAATATACCTTACACAATATCGATCRAACGA 9060 MinFLC
*****

9061 GGTAAAAAACCCATGGGTTTACATTGATAGATAATCAAACCTCTTAGTGGATTCAATTTAT 9120 RSV_WT
9061 GGTAAAAAACCCATGGGTTTACATTGATAGATAATCAAACCTCTTAGTGGATTCAATTTAT 9120 MinA
9061 GGTAAAAAACCCATGGGTTTACATTGATAGATAATCAAACCTCTTAGTGGATTCAATTTAT 9120 MinB
9061 AGTGA AAAATCACGGTTTTACATTGATAGATAATCAAACATTAAGCGGATTTCATTCAT 9120 MinL
9061 AGTGA AAAATCACGGTTTTACATTGATAGATAATCAAACATTAAGCGGATTTCATTCAT 9120 MinFLC
*****

9121 TTTGAACCAATATGGTTGTATAGTTTATCATAAAGGAACCTCAAAGAATTACTGTGACAAC 9180 RSV_WT
9121 TTTGAACCAATATGGTTGTATAGTTTATCATAAAGGAACCTCAAAGAATTACTGTGACAAC 9180 MinA
9121 TTTGAACCAATATGGTTGTATAGTTTATCATAAAGGAACCTCAAAGAATTACTGTGACAAC 9180 MinB
9121 ACTTAACCAATACCGGTGTATAGTTTATCATAAAGGAATTGAACGTTATAACCGTTACAAC 9180 MinL
9121 ACTTAACCAATACCGGTGTATAGTTTATCATAAAGGAATTGAACGTTATAACCGTTACAAC 9180 MinFLC
*****

9181 CTATAATCAATTCTTGACATGGAAGATATTAAGCCTTAGTAGATTAATGTTGTTTAAAT 9240 RSV_WT
9181 CTATAATCAATTCTTGACATGGAAGATATTAAGCCTTAGTAGATTAATGTTGTTTAAAT 9240 MinA
9181 CTATAATCAATTCTTGACATGGAAGATATTAAGCCTTAGTAGATTAATGTTGTTTAAAT 9240 MinB
9181 ATATAATCAATTCTTAACATGGAAGATATAAGTCTATCTAGATTGAACGTTATGCTTAAAT 9240 MinL
9181 ATATAATCAATTCTTAACATGGAAGATATAAGTCTATCTAGATTGAACGTTATGCTTAAAT 9240 MinFLC
*****

9241 TACATGGATTAGTAACTGCTTGAACACATTAATAAAGGCTTAGGCTTAAGTGCAGGATT 9300 RSV_WT
9241 TACATGGATTAGTAACTGCTTGAACACATTAATAAAGGCTTAGGCTTAAGTGCAGGATT 9300 MinA
9241 TACATGGATTAGTAACTGCTTGAACACATTAATAAAGGCTTAGGCTTAAGTGCAGGATT 9300 MinB
9241 TACATGGATTTCGAATTCCTTAATACACTTAATAAATCATTAGGCTTAAGTGCAGGATT 9300 MinL
9241 TACATGGATTTCGAATTCCTTAATACACTTAATAAATCATTAGGCTTAAGTGCAGGATT 9300 MinFLC
*****

9301 CAATAATGTTATCTTGACACAACCTATTCCTTTATGGAGATTGTATACTAAGCTATTTCA 9360 RSV_WT
9301 CAATAATGTTATCTTGACACAACCTATTCCTTTATGGAGATTGTATACTAAGCTATTTCA 9360 MinA
9301 CAATAATGTTATCTTGACACAACCTATTCCTTTATGGAGATTGTATACTAAGCTATTTCA 9360 MinB
9301 TAATAACCTTATACTTACACAATTGTTCTTATAAGGAGATTGTATACTAAGTTGTTCCA 9360 MinL
9301 TAATAACCTTATACTTACACAATTGTTCTTATAAGGAGATTGTATACTAAGTTGTTCCA 9360 MinFLC
*****

9361 CAATGAGGGGTTCTACATAATAAAGAGGTTAGAGGGATTATTATGTCTCTAAATTTAAA 9420 RSV_WT
9361 CAATGAGGGGTTCTACATAATAAAGAGGTTAGAGGGATTATTATGTCTCTAAATTTAAA 9420 MinA
9361 CAATGAGGGGTTCTACATAATAAAGAGGTTAGAGGGATTATTATGTCTCTAAATTTAAA 9420 MinB
9361 TAACGAAGGGTTTTATATAATAAAGAGGTTGAGGGATTATAATGTCATTGATCTGAA 9420 MinL
9361 TAACGAAGGGTTTTATATAATAAAGAGGTTGAGGGATTATAATGTCATTGATCTGAA 9420 MinFLC
*****

9421 TATAACAGAAGAAGATCAATTCAGAAAACGATTTTATAATAGTATGCTCAACACATCAC 9480 RSV_WT
9421 TATAACAGAAGAAGATCAATTCAGAAAACGATTTTATAATAGTATGCTCAACACATCAC 9480 MinA
9421 TATAACAGAAGAAGATCAATTCAGAAAACGATTTTATAATAGTATGCTCAACACATCAC 9480 MinB
9421 TAITACCGAAGAGGATCAATTTAGAAAAGATTCTATAATACTATGTTAAACAATATAAC 9480 MinL
9421 TAITACCGAAGAGGATCAATTTAGAAAAGATTCTATAATACTATGTTAAACAATATAAC 9480 MinFLC
*****

9481 AGATGCTGCTAATAAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACATTATTAGA 9540 RSV_WT
9481 AGATGCTGCTAATAAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACATTATTAGA 9540 MinA
9481 AGATGCTGCTAATAAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACATTATTAGA 9540 MinB
9481 TGACGCACTAATAAAGCGCAGAAGATCTGTTATCTAGAGTATGTCATACATTATTAGA 9540 MinL
9481 TGACGCACTAATAAAGCGCAGAAGATCTGTTATCTAGAGTATGTCATACATTATTAGA 9540 MinFLC
*****

```

Figura 7 (cont.)


```

10141 TTATTTAAGAGATAACAAATTC AATGAATGTGATTTATACAACCTGTGTAGTTAATCAAAG 10200 RSV_WT
10141 TTATTTAAGAGATAACAAATTC AATGAATGTGATTTATACAACCTGTGTAGTTAATCAAAG 10200 MinA
10141 TTATTTAAGAGATAACAAATTC AATGAATGTGATTTATACAACCTGTGTAGTTAATCAAAG 10200 MinB
10141 TTACTTACGGGATAATAAATTTA ACGAATGCGATCTATATAATTGCGTAGTGAACCAATC 10200 MinL
10141 TTACTTACGGGATAATAAATTTA ACGAATGCGATCTATATAATTGCGTAGTGAACCAATC 10200 MinFLC
**** **.*.***** ** ** ** **

10201 TTATCTCAACCAACCTAATCATG TGGTATCATTGACAGGCAAGAAAGAGAACTCAGTGT 10260 RSV_WT
10201 TTATCTCAACCAACCTAATCATG TGGTATCATTGACAGGCAAGAAAGAGAACTCAGTGT 10260 MinA
10201 TTATCTCAACCAACCTAATCATG TGGTATCATTGACAGGCAAGAAAGAGAACTCAGTGT 10260 MinB
10201 ATATCTTAATAATCCTAATCAOG IAGTGAGTCITACAGGTRAGGAAAGAGAGTTGAGCGT 10260 MinL
10201 ATATCTTAATAATCCTAATCAOG IAGTGAGTCITACAGGTRAGGAAAGAGAGTTGAGCGT 10260 MinFLC
:***** ** ** ** ** : * ** ** ** . * ** **

10261 AGGTAGAAATGTTTGCAATGCA AACCAGGGAATGTTGACAGAGGTTCAAATATTGGCAGAGAA 10320 RSV_WT
10261 AGGTAGAAATGTTTGCAATGCA AACCAGGGAATGTTGACAGAGGTTCAAATATTGGCAGAGAA 10320 MinA
10261 AGGTAGAAATGTTTGCAATGCA AACCAGGGAATGTTGACAGAGGTTCAAATATTGGCAGAGAA 10320 MinB
10261 AGGTAGAAATGTTGCGTATGCA AACCAGGGAATGTTGACAGAGGTTCAAATATTGGCAGAGAA 10320 MinL
10261 AGGTAGAAATGTTGCGTATGCA AACCAGGGAATGTTGACAGAGGTTCAAATATTGGCAGAGAA 10320 MinFLC
***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10321 AATGATAGCTGAAAACATTTTACA AATTCCTTCGAAAGTCTTACAAGATATGGTGATCT 10380 RSV_WT
10321 AATGATAGCTGAAAACATTTTACA AATTCCTTCGAAAGTCTTACAAGATATGGTGATCT 10380 MinA
10321 AATGATAGCTGAAAACATTTTACA AATTCCTTCGAAAGTCTTACAAGATATGGTGATCT 10380 MinB
10321 GATGATAGCCGAAAATATACTGCA AATTCCTTCGAAAGTCTTACAAGATATGGTGATCT 10380 MinL
10321 GATGATAGCCGAAAATATACTGCA AATTCCTTCGAAAGTCTTACAAGATATGGTGATCT 10380 MinFLC
***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10381 AGAACTACAAAAATATTAGA AACTGAAAGCAGGGAATAGTAAACAAATCAAATCGCTACAA 10440 RSV_WT
10381 AGAACTACAAAAATATTAGA AACTGAAAGCAGGGAATAGTAAACAAATCAAATCGCTACAA 10440 MinA
10381 AGAACTACAAAAATATTAGA AACTGAAAGCAGGGAATAGTAAACAAATCAAATCGCTACAA 10440 MinB
10381 AGAACTACAAAAATATTAGA AACTGAAAGCAGGGAATAGTAAACAAATCAAATCGCTACAA 10440 MinL
10381 AGAACTACAAAAATATTAGA AACTGAAAGCAGGGAATAGTAAACAAATCAAATCGCTACAA 10440 MinFLC
**** *.*.***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10441 TGATAATTACAACAATTACATTA GTAAGTGCTCTATCATCACAGATCTCAGCAAAATCAA 10500 RSV_WT
10441 TGATAATTACAACAATTACATTA GTAAGTGCTCTATCATCACAGATCTCAGCAAAATCAA 10500 MinA
10441 TGATAATTACAACAATTACATTA GTAAGTGCTCTATCATCACAGATCTCAGCAAAATCAA 10500 MinB
10441 CGATAATTATAAATAATATATA TCTAAGTGTAGTATTATTACCGATCTATCTAAATCAA 10500 MinL
10441 CGATAATTATAAATAATATATA TCTAAGTGTAGTATTATTACCGATCTATCTAAATCAA 10500 MinFLC
***** **.*.***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10501 TCAAGCATTTGATATGAAA ACGTCAATGATTTGTAAGTGTGCTGGATGAACCTGCATGG 10560 RSV_WT
10501 TCAAGCATTTGATATGAAA ACGTCAATGATTTGTAAGTGTGCTGGATGAACCTGCATGG 10560 MinA
10501 TCAAGCATTTGATATGAAA ACGTCAATGATTTGTAAGTGTGCTGGATGAACCTGCATGG 10560 MinB
10501 TCAGGCATTTAGATACGAAA AACTAGTTGATATGCTCAGACGATATTAGACGAATTCACCGG 10560 MinL
10501 TCAGGCATTTAGATACGAAA AACTAGTTGATATGCTCAGACGATATTAGACGAATTCACCGG 10560 MinFLC
***.***** **.*.***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10561 TGTACAATCTCTATTTTCC TGGTTACATTTAACTATTCCTCATGTCACAAATATGTCAC 10620 RSV_WT
10561 TGTACAATCTCTATTTTCC TGGTTACATTTAACTATTCCTCATGTCACAAATATGTCAC 10620 MinA
10561 TGTACAATCTCTATTTTCC TGGTTACATTTAACTATTCCTCATGTCACAAATATGTCAC 10620 MinB
10561 AGTGCAATCTTTGTTAGT TGGTTACATTTAACTATTCCTCATGTCACAAATATGTCAC 10620 MinL
10561 AGTGCAATCTTTGTTAGT TGGTTACATTTAACTATTCCTCATGTCACAAATATGTCAC 10620 MinFLC
:***.***** **.*.***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10621 ATATAGGCATGCACCCCCCTA TATAGGAGATCATATTGTAGATCTTAACAATGTAGATGA 10680 RSV_WT
10621 ATATAGGCATGCACCCCCCTA TATAGGAGATCATATTGTAGATCTTAACAATGTAGATGA 10680 MinA
10621 ATATAGGCATGCACCCCCCTA TATAGGAGATCATATTGTAGATCTTAACAATGTAGATGA 10680 MinB
10621 ATATAGACACGCCACCACCA TATATAGGCGATCATATAGTCGATCTGAATAACGTAGACGA 10680 MinL
10621 ATATAGACACGCCACCACCA TATATAGGCGATCATATAGTCGATCTGAATAACGTAGACGA 10680 MinFLC
***** **.*.***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

10681 ACAAAAGTGGATTATATAGATAT CACATGGGTGGCATCGAAGGGTGGTGTCAAAAATATG 10740 RSV_WT
10681 ACAAAAGTGGATTATATAGATAT CACATGGGTGGCATCGAAGGGTGGTGTCAAAAATATG 10740 MinA
10681 ACAAAAGTGGATTATATAGATAT CACATGGGTGGCATCGAAGGGTGGTGTCAAAAATATG 10740 MinB
10681 ACAATCCGGATTGTATAGATAT CACATGGGTGGCATAGAGGGATGGTGTCAAAAATATG 10740 MinL
10681 ACAATCCGGATTGTATAGATAT CACATGGGTGGCATAGAGGGATGGTGTCAAAAATATG 10740 MinFLC
***** **.*.***** **.*.***** **.*.***** ** ** **

```

Figura 7 (cont.)

```

10741 GACCATAGAAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCTCAAAGGGGAAATTCCTCAATTAC 10800 RSV_WT
10741 GACCATAGAAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCTCAAAGGGGAAATTCCTCAATTAC 10800 MinA
10741 GACCATAGAAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCTCAAAGGGGAAATTCCTCAATTAC 10800 MinB
10741 GACTATAGAGGCCAATTAGTCTGTAGATCTAATTAGTCTTAAGGGTAAGTTTCGATTAC 10800 MinL
10741 GACTATAGAGGCCAATTAGTCTGTAGATCTAATTAGTCTTAAGGGTAAGTTTCGATTAC 10800 MinFLC
*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
10801 TGCTTTAATTAATGTTGACAATCAATCAATAGATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGA 10860 RSV_WT
10801 TGCTTTAATTAATGTTGACAATCAATCAATAGATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGA 10860 MinA
10801 TGCTTTAATTAATGTTGACAATCAATCAATAGATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGA 10860 MinB
10801 CGCAITGATTAACGGTGATAATCAATCAATGATATATCTAAACCGGATACGGTTAATGGA 10860 MinL
10801 CGCAITGATTAACGGTGATAATCAATCAATGATATATCTAAACCGGATACGGTTAATGGA 10860 MinFLC
**:* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
10861 AGGTCAAACCTCATGCTCAAGCAGATTATTTGCTAGCATTAAATAGCCCTAAATTAATCTGTA 10920 RSV_WT
10861 AGGTCAAACCTCATGCTCAAGCAGATTATTTGCTAGCATTAAATAGCCCTAAATTAATCTGTA 10920 MinA
10861 AGGTCAAACCTCATGCTCAAGCAGATTATTTGCTAGCATTAAATAGCCCTAAATTAATCTGTA 10920 MinB
10861 GGGACAAACACACGCTCAAGCCGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 10920 MinL
10861 GGGACAAACACACGCTCAAGCCGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 10920 MinFLC
:*:***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *:*: ** ** ** *:*: ** ** ** *:*:
10921 TAAAGAGTATGCAGGCATAGGCCACAAATTAAGGAACTGAGACTTATATATCAOGAGA 10980 RSV_WT
10921 TAAAGAGTATGCAGGCATAGGCCACAAATTAAGGAACTGAGACTTATATATCAOGAGA 10980 MinA
10921 TAAAGAGTATGCAGGCATAGGCCACAAATTAAGGAACTGAGACTTATATATCAOGAGA 10980 MinB
10921 CAAAGAGTACCGAGGTATAGGCCATAAATTAAGGAACTGAGACTTATATATCAOGAGA 10980 MinL
10921 CAAAGAGTACCGAGGTATAGGCCATAAATTAAGGAACTGAGACTTATATATCAOGAGA 10980 MinFLC
***** ** ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*:
10981 TATGCAATTTATGASTAAACCAATCAACATAACCGGTATATATACCCAGCTAGTATAAA 11040 RSV_WT
10981 TATGCAATTTATGASTAAACCAATCAACATAACCGGTATATATACCCAGCTAGTATAAA 11040 MinA
10981 TATGCAATTTATGASTAAACCAATCAACATAACCGGTATATATACCCAGCTAGTATAAA 11040 MinB
10981 TATGCAATTTATGASTAAACCAATCAACATAACCGGTATATATACCCAGCTAGTATAAA 11040 MinL
10981 TATGCAATTTATGASTAAACCAATCAACATAACCGGTATATATACCCAGCTAGTATAAA 11040 MinFLC
***** ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*:
11041 GAAAGTCTAAGAGTGGGACCGTGGATAAACACTATACTTGATGATTTCAAAGTGAATCT 11100 RSV_WT
11041 GAAAGTCTAAGAGTGGGACCGTGGATAAACACTATACTTGATGATTTCAAAGTGAATCT 11100 MinA
11041 GAAAGTCTAAGAGTGGGACCGTGGATAAACACTATACTTGATGATTTCAAAGTGAATCT 11100 MinB
11041 GAAAGTCTAAGAGTGGGACCGTGGATAAACACTATACTTGATGATTTCAAAGTGAATCT 11100 MinL
11041 GAAAGTCTAAGAGTGGGACCGTGGATAAACACTATACTTGATGATTTCAAAGTGAATCT 11100 MinFLC
***** ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*:
11101 AGAATCTATAGGTAGTTTGACACAAGAATTAGAATATAGAGGTGAAAGTCTATTATGCAG 11160 RSV_WT
11101 AGAATCTATAGGTAGTTTGACACAAGAATTAGAATATAGAGGTGAAAGTCTATTATGCAG 11160 MinA
11101 AGAATCTATAGGTAGTTTGACACAAGAATTAGAATATAGAGGTGAAAGTCTATTATGCAG 11160 MinB
11101 CGAATCAATCGGATCATTGACACAAGAGTTGGAGTATAGAGGCGAATCTCTATTATGCCT 11160 MinL
11101 CGAATCAATCGGATCATTGACACAAGAGTTGGAGTATAGAGGCGAATCTCTATTATGCCT 11160 MinFLC
*:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*:
11161 TTTAATATTTAGAAATGTATGGTTATATARTCAGATTGCTCTACAAATTAATAAATCATGC 11220 RSV_WT
11161 TTTAATATTTAGAAATGTATGGTTATATARTCAGATTGCTCTACAAATTAATAAATCATGC 11220 MinA
11161 TTTAATATTTAGAAATGTATGGTTATATARTCAGATTGCTCTACAAATTAATAAATCATGC 11220 MinB
11161 ATTGATTTTGAACCGTATGGTTATACAAATCAGATTGCTCTACAAATTAATAAATCATGC 11220 MinL
11161 ATTGATTTTGAACCGTATGGTTATACAAATCAGATTGCTCTACAAATTAATAAATCATGC 11220 MinFLC
*:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*:
11221 ATTATGTAACAATAAATATATTTGGACATATTAAGGTTCTGAAACACTTAAAAACCTT 11280 RSV_WT
11221 ATTATGTAACAATAAATATATTTGGACATATTAAGGTTCTGAAACACTTAAAAACCTT 11280 MinA
11221 ATTATGTAACAATAAATATATTTGGACATATTAAGGTTCTGAAACACTTAAAAACCTT 11280 MinB
11221 ACTATGTAACAATAAATATTTGGACATATTAAGGTTCTGAAACACTTAAAAACCTT 11280 MinL
11221 ACTATGTAACAATAAATATTTGGACATATTAAGGTTCTGAAACACTTAAAAACCTT 11280 MinFLC
* ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *
11261 TTTAATCTTGATAATATTGATACAGCATTAAACATTTGTATATGAATTTACCCATGTTATT 11340 RSV_WT
11261 TTTAATCTTGATAATATTGATACAGCATTAAACATTTGTATATGAATTTACCCATGTTATT 11340 MinA
11261 TTTAATCTTGATAATATTGATACAGCATTAAACATTTGTATATGAATTTACCCATGTTATT 11340 MinB
11261 CTTAATCTTGATAATATTGATACAGCATTAAACATTTGTATATGAATTTACCCATGTTATT 11340 MinL
11261 CTTAATCTTGATAATATTGATACAGCATTAAACATTTGTATATGAATTTACCCATGTTATT 11340 MinFLC
***** ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*: ** ** *:*:

```

Figura 7 (cont.)

ES 2 952 387 T3

11941 CAGAGATAAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTAAGTATTACTGAAATTAAGCAAATA 12000 RSV_WT
 11941 CAGAGATAAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTAAGTATTACTGAAATTAAGCAAATA 12000 MinA
 11941 CAGAGATAAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTAAGTATTACTGAAATTAAGCAAATA 12000 MinB
 11941 TAGGGATAAAAAGAGAGATACTATCTATGGAGAATCTATCAATTACAGAAATGTCAAAATA 12000 MinL
 11941 TAGGGATAAAAAGAGAGATACTATCTATGGAGAATCTATCAATTACAGAAATGTCAAAATA 12000 MinFLC
 *.*****. *.: *****. ** ***: :*****.*****.: .*****

12001 TGTTAGGGAAAGATCTTGGTCTTTATCCAATATAGTTGGTGTACATCACCAGTATCAT 12060 RSV_WT
 12001 TGTTAGGGAAAGATCTTGGTCTTTATCCAATATAGTTGGTGTACATCACCAGTATCAT 12060 MinA
 12001 TGTTAGGGAAAGATCTTGGTCTTTATCCAATATAGTTGGTGTACATCACCAGTATCAT 12060 MinB
 12001 CGTTAGGGAAACGATCATGGTCACTATCTAATATCGTAGGCCGTACTAGTCTCTAGTATTAT 12060 MinL
 12001 CGTTAGGGAAACGATCATGGTCACTATCTAATATCGTAGGCCGTACTAGTCTCTAGTATTAT 12060 MinFLC
 *****.*****.*****: **** *****.*** ***: : ** ***** **

12061 GTATACAATGGACATCAAATATACTACAAGCACTATATCTAGTGGCATAAATTATAGAGAA 12120 RSV_WT
 12061 GTATACAATGGACATCAAATATACTACAAGCACTATATCTAGTGGCATAAATTATAGAGAA 12120 MinA
 12061 GTATACAATGGACATCAAATATACTACAAGCACTATATCTAGTGGCATAAATTATAGAGAA 12120 MinB
 12061 GTATACTATGGATATTAAGTATACAACCTAGTACAAATAGTAGCGGTATAAATATCGAAAA 12120 MinL
 12061 GTATACTATGGATATTAAGTATACAACCTAGTACAAATAGTAGCGGTATAAATATCGAAAA 12120 MinFLC
 *****:***** ** ***.*****:*** ***: ***: ** ** *****:***.***.***

12121 ATATAATGTTAACAATTTAACACGTTGGTGGAGAGGAGGCCACTAAACCATGGGTTGGTTC 12180 RSV_WT
 12121 ATATAATGTTAACAATTTAACACGTTGGTGGAGAGAGGCCACTAAACCATGGGTTGGTTC 12180 MinA
 12121 ATATAATGTTAACAATTTAACACGTTGGTGGAGAGAGGCCACTAAACCATGGGTTGGTTC 12180 MinB
 12121 ATATAACGTTAATAGTCTAACACGTTGGTGGAAAGGGGACCTACAAAACCTTGGTCCGGATC 12180 MinL
 12121 ATATAACGTTAATAGTCTAACACGTTGGTGGAAAGGGGACCTACAAAACCTTGGTCCGGATC 12180 MinFLC
 ***** ***** ** *****.*****. ** ***** ***:*****:***** ****

12181 ATCTACACAAGAGAAAAAACAATGCCAGTTTATAATAGACAAGTCTTAACCAAAAAACA 12240 RSV_WT
 12181 ATCTACACAAGAGAAAAAACAATGCCAGTTTATAATAGACAAGTCTTAACCAAAAAACA 12240 MinA
 12181 ATCTACACAAGAGAAAAAACAATGCCAGTTTATAATAGACAAGTCTTAACCAAAAAACA 12240 MinB
 12181 TAGTACACAAGAGAAAAAACAATGCCAGTTTATAATAGACAAGTCTTAACCAAAAAACA 12240 MinL
 12181 TAGTACACAAGAGAAAAAACAATGCCAGTTTATAATAGACAAGTCTTAACCAAAAAACA 12240 MinFLC
 :.*****.*****:*****.***:*****.*****.***.*** ** ** *****

12241 GAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAAATGGATTGGGTGTATGCATCTATAGATAACAA 12300 RSV_WT
 12241 GAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAAATGGATTGGGTGTATGCATCTATAGATAACAA 12300 MinA
 12241 GAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAAATGGATTGGGTGTATGCATCTATAGATAACAA 12300 MinB
 12241 ACCGAGATCAAATAGATCTATTAGCTAAACTCGATTGGGTATACGGTATAGATAAATAA 12300 MinL
 12241 ACCGAGATCAAATAGATCTATTAGCTAAACTCGATTGGGTATACGGTATAGATAAATAA 12300 MinFLC
 ..*****.*****:*****.*** ** *****.*** ***: ***** **

12301 GGATGAATTCATGGAAGAACTCAGCATAGGAACCTTGGGTTAACATATGAAAAGGCCAA 12360 RSV_WT
 12301 GGATGAATTCATGGAAGAACTCAGCATAGGAACCTTGGGTTAACATATGAAAAGGCCAA 12360 MinA
 12301 GGATGAATTCATGGAAGAACTCAGCATAGGAACCTTGGGTTAACATATGAAAAGGCCAA 12360 MinB
 12301 AGACGAATTTATGGAAGAGTTGTCMAATCGGTACATTAGGGTTAACATACGAAAAAGCTAA 12360 MinL
 12301 AGACGAATTTATGGAAGAGTTGTCMAATCGGTACATTAGGGTTAACATACGAAAAAGCTAA 12360 MinFLC
 .** ***** ***** . * : ** ***: ***. *.:*****.***** ***** ** **

12361 GAAATTAATTTCCACAATATTTAAGTGTCAATTAATTTGCATCGCCTTACAGTCAGTAGTAG 12420 RSV_WT
 12361 GAAATTAATTTCCACAATATTTAAGTGTCAATTAATTTGCATCGCCTTACAGTCAGTAGTAG 12420 MinA
 12361 GAAATTAATTTCCACAATATTTAAGTGTCAATTAATTTGCATCGCCTTACAGTCAGTAGTAG 12420 MinB
 12361 GAAATTTGTTCCACAATATCTATCAGTGAATTAATTTGCATCGCCTTACAGTCAGTAGTAG 12420 MinL
 12361 GAAATTTGTTCCACAATATCTATCAGTGAATTAATTTGCATCGCCTTACAGTCAGTAGTAG 12420 MinFLC
 *****.*** ***** ***: : ** ***** ***.***.*** * ***** *****

12421 ACCATGTGAATTCCTGCATCAATACCAGCTTATAGAACAACAAATTAATCACTTTGACAC 12480 RSV_WT
 12421 ACCATGTGAATTCCTGCATCAATACCAGCTTATAGAACAACAAATTAATCACTTTGACAC 12480 MinA
 12421 ACCATGTGAATTCCTGCATCAATACCAGCTTATAGAACAACAAATTAATCACTTTGACAC 12480 MinB
 12421 ACCATGCGAATTTCCCGCTAGTATACCGCATATAGAACAACAAATTAATCACTTTGACAC 12480 MinL
 12421 ACCATGCGAATTTCCCGCTAGTATACCGCATATAGAACAACAAATTAATCACTTTGACAC 12480 MinFLC
 ***** ***** ** ***: :*****.***:*****.*****:***** ** ** **

12481 TAGCCCTAATTAATCGCATATTAACGAAAAAGTATGGTGTAGAGATATGACATAGTATT 12540 RSV_WT
 12481 TAGCCCTAATTAATCGCATATTAACGAAAAAGTATGGTGTAGAGATATGACATAGTATT 12540 MinA
 12481 TAGCCCTAATTAATCGCATATTAACGAAAAAGTATGGTGTAGAGATATGACATAGTATT 12540 MinB
 12481 TAGTCCAAATTAATAGATATTAACGAAAAATACGGAGACGAGATATAGATATCGTATT 12540 MinL
 12481 TAGTCCAAATTAATAGATATTAACGAAAAATACGGAGACGAGATATAGATATCGTATT 12540 MinFLC
 *** ***:*****.***:*****.*****.*** ***: *****:*** ** *****

Figura 7 (cont.)

12541	CCAAAACCTGTATAAGCTTTGGCCCTTAGTTTAAATGTCAGTAGTAGAACAATTTACTAA7GT	12600	RSV_WT
12541	CCAAAACCTGTATAAGCTTTGGCCCTTAGTTTAAATGTCAGTAGTAGAACAATTTACTAA7GT	12600	MinA
12541	CCAAAACCTGTATAAGCTTTGGCCCTTAGTTTAAATGTCAGTAGTAGAACAATTTACTAA7GT	12600	MinB
12541	CCAAAATTTGTATTAGTTTCGGATTGAGTCTTATGTCGGTAGTCGAACAATTTACTAACGT	12600	MinL
12541	CCAAAATTTGTATTAGTTTCGGATTGAGTCTTATGTCGGTAGTCGAACAATTTACTAACGT	12600	MinFLC
	***** ** ** ** * ** *;*****;*****;***** **		
12601	ATGTCCTAACAGAAATTTCTCATAACCTAAGCTTAAATGAGATACATTTGATGAAACCTCC	12660	RSV_WT
12601	ATGTCCTAACAGAAATTTCTCATAACCTAAGCTTAAATGAGATACATTTGATGAAACCTCC	12660	MinA
12601	ATGTCCTAACAGAAATTTCTCATAACCTAAGCTTAAATGAGATACATTTGATGAAACCTCC	12660	MinB
12601	ATGTCCTAATAGGATTTACTGATAACCTAAATGAAACGAAATACATCTTATGAAACCTCC	12660	MinL
12601	ATGTCCTAATAGGATTTACTGATAACCTAAATGAAACGAAATACATCTTATGAAACCTCC	12660	MinFLC
	***** **;*****;*****;***** **		
12661	CATATTCACAGGTGATGTTGATATTCACAAGTTAAAACAAGTGATACAAAACAGCATAT	12720	RSV_WT
12661	CATATTCACAGGTGATGTTGATATTCACAAGTTAAAACAAGTGATACAAAACAGCATAT	12720	MinA
12661	CATATTCACAGGTGATGTTGATATTCACAAGTTAAAACAAGTGATACAAAACAGCATAT	12720	MinB
12661	TATTTTACAGGCGATGTCGATATACACAATGAAACAGGTTATACAAAACAGCATAT	12720	MinL
12661	TATTTTACAGGCGATGTCGATATACACAATGAAACAGGTTATACAAAACAGCATAT	12720	MinFLC
	** ** ***** ** **;*****;*****;***** **		
12721	GTTTTTACCAGACAAAATAAGTTTGAATCAATATGTTGAAATATTTCTTAAAGTAAATAAAC	12780	RSV_WT
12721	GTTTTTACCAGACAAAATAAGTTTGAATCAATATGTTGAAATATTTCTTAAAGTAAATAAAC	12780	MinA
12721	GTTTTTACCAGACAAAATAAGTTTGAATCAATATGTTGAAATATTTCTTAAAGTAAATAAAC	12780	MinB
12721	GTTCTTACCAGATAAGATATCGTTAACGCAATACGTTGAGITGTTCTTATCAATAAAAAC	12780	MinL
12721	GTTCTTACCAGATAAGATATCGTTAACGCAATACGTTGAGITGTTCTTATCAATAAAAAC	12780	MinFLC
	*** ***** ** **; ** ** ***** ** **;*****;*****;*****		
12781	ACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTTCAATTTAATATPCCACATAAAATATCTGACTA	12840	RSV_WT
12781	ACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTTCAATTTAATATPCCACATAAAATATCTGACTA	12840	MinA
12781	ACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTTCAATTTAATATPCCACATAAAATATCTGACTA	12840	MinB
12781	ACTTAAATCAGGTAGTCACGTTAATAGTAAATCTGATCTCCACATAAAATAGCGATTA	12840	MinL
12781	ACTTAAATCAGGTAGTCACGTTAATAGTAAATCTGATCTCCACATAAAATAGCGATTA	12840	MinFLC
	*** *****;***; ** *****; **** *;*** * *****; ** **		
12841	TTTTCATARTACTTACATTTTAAAGTACTAATTTAGCTGGACATTTGGATTCTGATTATACA	12900	RSV_WT
12841	TTTTCATARTACTTACATTTTAAAGTACTAATTTAGCTGGACATTTGGATTCTGATTATACA	12900	MinA
12841	TTTTCATARTACTTACATTTTAAAGTACTAATTTAGCTGGACATTTGGATTCTGATTATACA	12900	MinB
12841	CTTTCATARTACATATATATTGAGTACTAATTTAGCTGGACATTTGGATTCTGATTATACA	12900	MinL
12841	CTTTCATARTACATATATATTGAGTACTAATTTAGCTGGACATTTGGATTCTGATTATACA	12900	MinFLC
	*****;***; **;***** ***** *****;*****;*****		
12901	ACTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTTTGAAGAAGATTGGGGAGAGGGATATATAACTGA	12960	RSV_WT
12901	ACTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTTTGAAGAAGATTGGGGAGAGGGATATATAACTGA	12960	MinA
12901	ACTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTTTGAAGAAGATTGGGGAGAGGGATATATAACTGA	12960	MinB
12901	ATTGATGAAAGATAGTAAAGGTATATTCGAAAAGATTGGGGTGGGGATATATAACCGA	12960	MinL
12901	ATTGATGAAAGATAGTAAAGGTATATTCGAAAAGATTGGGGTGGGGATATATAACCGA	12960	MinFLC
	* * *****; ***;*****;** *****;*****;*****;***** **		
12961	TCATATGTTTAAATTTGAAAGTTTCTTCAATGCTTATAGACCTATCTCTTGTGTTT	13020	RSV_WT
12961	TCATATGTTTAAATTTGAAAGTTTCTTCAATGCTTATAGACCTATCTCTTGTGTTT	13020	MinA
12961	TCATATGTTTAAATTTGAAAGTTTCTTCAATGCTTATAGACCTATCTCTTGTGTTT	13020	MinB
12961	TCATATGTTTAAACCTTAAGGTCCTTTAAACGATATAAACTTATCTATTATGTTT	13020	MinL
12961	TCATATGTTTAAACCTTAAGGTCCTTTAAACGATATAAACTTATCTATTATGTTT	13020	MinFLC
	*****;*** * **;***** ***** **;*****;***** **;*****		
13021	TCATAAAGGTTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATGACACTTCAGATCTTCTATG	13080	RSV_WT
13021	TCATAAAGGTTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATGACACTTCAGATCTTCTATG	13080	MinA
13021	TCATAAAGGTTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATGACACTTCAGATCTTCTATG	13080	MinB
13021	TCATAAGGGATACGGTAAGGCTAAACTCGAATGCGATATGAATACATCCGATCTATTATG	13080	MinL
13021	TCATAAGGGATACGGTAAGGCTAAACTCGAATGCGATATGAATACATCCGATCTATTATG	13080	MinFLC
	*****;***; ** **;*****;*****;***** *****;*****;*****		
13081	TGTATTGGAATTAATAGACAGTAGTTATTGGAAGTCTATGCTAAGGTATTTTGAACA	13140	RSV_WT
13081	TGTATTGGAATTAATAGACAGTAGTTATTGGAAGTCTATGCTAAGGTATTTTGAACA	13140	MinA
13081	TGTATTGGAATTAATAGACAGTAGTTATTGGAAGTCTATGCTAAGGTATTTTGAACA	13140	MinB
13081	CGTACTCGAATTAATGATAGTAGCTATTGGAATCTATGASTAAGGTATTTCTAGAGCA	13140	MinL
13081	CGTACTCGAATTAATGATAGTAGCTATTGGAATCTATGASTAAGGTATTTCTAGAGCA	13140	MinFLC
	*** * *****;** ***** *****;*****;***** ***** **		

Figura 7 (cont.)

```

13141 AAAAGTTATCAAATACATTCTTAGCCAAGATGCAAGTTTACATAGAGTAAAAGGATGTC 13200 RSV_WT
13141 AAAAGTTATCAAATACATTCTTAGCCAAGATGCAAGTTTACATAGAGTAAAAGGATGTC 13200 MinA
13141 AAAAGTTATCAAATACATTCTTAGCCAAGATGCAAGTTTACATAGAGTAAAAGGATGTC 13200 MinB
13141 AAAGGTGATCAAGTATATACTATCTCAAGACGCTAGTTTGCATAGGGTTAAGGGATGTC 13200 MinL
13141 AAAGGTGATCAAGTATATACTATCTCAAGACGCTAGTTTGCATAGGGTTAAGGGATGTC 13200 MinFLC
***.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13201 TAGCTTCAAATATGGTTTCTTAAACGCTTAAATGTAGCAGAAATTCACAGTTTGCCTTG 13260 RSV_WT
13201 TAGCTTCAAATATGGTTTCTTAAACGCTTAAATGTAGCAGAAATTCACAGTTTGCCTTG 13260 MinA
13201 TAGCTTCAAATATGGTTTCTTAAACGCTTAAATGTAGCAGAAATTCACAGTTTGCCTTG 13260 MinB
13201 TAGTTTTAAATATGGTTTCTTAAAGATTGAACGTAGCCGAATTTACAGTATGCTCTTG 13260 MinL
13201 TAGTTTTAAATATGGTTTCTTAAAGATTGAACGTAGCCGAATTTACAGTATGCTCTTG 13260 MinFLC
***.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13261 GGTGTTAAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCAATATTAACCTATATAGATCT 13320 RSV_WT
13261 GGTGTTAAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCAATATTAACCTATATAGATCT 13320 MinA
13261 GGTGTTAAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCAATATTAACCTATATAGATCT 13320 MinB
13261 GGTGTTAAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCAATATTAACCTATATAGATCT 13320 MinL
13261 GGTGTTAAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCAATATTAACCTATATAGATCT 13320 MinFLC
***.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13321 TGTTAGAATGGGATTGATAAATATAGATAGAAATACACATTTAAAATAAACACAAATTCAA 13380 RSV_WT
13321 TGTTAGAATGGGATTGATAAATATAGATAGAAATACACATTTAAAATAAACACAAATTCAA 13380 MinA
13321 TGTTAGAATGGGATTGATAAATATAGATAGAAATACACATTTAAAATAAACACAAATTCAA 13380 MinB
13321 AGTGAGAATGGGATTGATTAAACATAGATAGAAATACATATAAAGAAATAAACATAAAATTTAA 13380 MinL
13321 AGTGAGAATGGGATTGATTAAACATAGATAGAAATACATATAAAGAAATAAACATAAAATTTAA 13380 MinFLC
;.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13381 TGATGAATTTTACTTCTAATCTCTTCTACATTAATTAACCTTCTCAGATAAATCTCA 13440 RSV_WT
13381 TGATGAATTTTACTTCTAATCTCTTCTACATTAATTAACCTTCTCAGATAAATCTCA 13440 MinA
13381 TGATGAATTTTACTTCTAATCTCTTCTACATTAATTAACCTTCTCAGATAAATCTCA 13440 MinB
13381 CGACGAATCTACTAGTAACTAATCTAATCTATATAAATTAATTTTCCGATAAATACACA 13440 MinL
13381 CGACGAATCTACTAGTAACTAATCTAATCTAATTAATTTTCCGATAAATACACA 13440 MinFLC
.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13441 TCTATTAACATAAACAATATAAGGATTGCTAATCTGAATTAGAAAATAATTAACAACAAAT 13500 RSV_WT
13441 TCTATTAACATAAACAATATAAGGATTGCTAATCTGAATTAGAAAATAATTAACAACAAAT 13500 MinA
13441 TCTATTAACATAAACAATATAAGGATTGCTAATCTGAATTAGAAAATAATTAACAACAAAT 13500 MinB
13441 TCTATTAACATAAACAATATAAGGATTGCTAATCTGAATTAGAAAATAATTAACAACAAAT 13500 MinL
13441 TCTATTAACATAAACAATATAAGGATTGCTAATCTGAATTAGAAAATAATTAACAACAAAT 13500 MinFLC
***.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13501 ATATCATCTACACCAGAAACCCCTAGAGAATATACTAGCCAAATCCGATTTAAAAGTAATGA 13560 RSV_WT
13501 ATATCATCTACACCAGAAACCCCTAGAGAATATACTAGCCAAATCCGATTTAAAAGTAATGA 13560 MinA
13501 ATATCATCTACACCAGAAACCCCTAGAGAATATACTAGCCAAATCCGATTTAAAAGTAATGA 13560 MinB
13501 GTATCATCTACACCAGAAACCCCTAGAGAATATACTAGCCAAATCCGATTTAAAAGTAATGA 13560 MinL
13501 GTATCATCTACACCAGAAACCCCTAGAGAATATACTAGCCAAATCCGATTTAAAAGTAATGA 13560 MinFLC
***.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13561 CAAAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGGTAAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATT 13620 RSV_WT
13561 CAAAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGGTAAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATT 13620 MinA
13561 CAAAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGGTAAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATT 13620 MinB
13561 TAAGAAAACACTTAACGATTATTGTATAGGTAAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATT 13620 MinL
13561 TAAGAAAACACTTAACGATTATTGTATAGGTAAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATT 13620 MinFLC
***.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13621 GTTATCTAATAAGAGCTTATTAATCGTCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAAACA 13680 RSV_WT
13621 GTTATCTAATAAGAGCTTATTAATCGTCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAAACA 13680 MinA
13621 GTTATCTAATAAGAGCTTATTAATCGTCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAAACA 13680 MinB
13621 ACTATCAAAATAGAAATGATTAAATCTAGCGCTATGATTAGAACTAATTATAGTAAACA 13680 MinL
13621 ACTATCAAAATAGAAATGATTAAATCTAGCGCTATGATTAGAACTAATTATAGTAAACA 13680 MinFLC
.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

13681 AGATTTGTATAATTTATCCCTATGGTTGTGATTGATAGAATATAGATCAATCAGGCCAA 13740 RSV_WT
13681 AGATTTGTATAATTTATCCCTATGGTTGTGATTGATAGAATATAGATCAATCAGGCCAA 13740 MinA
13681 AGATTTGTATAATTTATCCCTATGGTTGTGATTGATAGAATATAGATCAATCAGGCCAA 13740 MinB
13681 GGATCTATATAACTTATCCCTATGGTCTGTAATGATAGAATATAGATCAATCAGGCCAA 13740 MinL
13681 GGATCTATATAACTTATCCCTATGGTCTGTAATGATAGAATATAGATCAATCAGGCCAA 13740 MinFLC
.*.*****.*.***.*.; *****.*.*****.*.***.*.*****

```

Figura 7 (cont.)

13741	TACAGCCAAATCCAACCAACTTTACACTACTACTTCCCACCAAATATCCTTAGTGCAAA	13800	RSV WT
13741	TACAGCCAAATCCAACCAACTTTACACTACTACTTCCCACCAAATATCCTTAGTGCAAA	13800	MinA
13741	TACAGCCAAATCCAACCAACTTTACACTACTACTTCCCACCAAATATCCTTAGTGCAAA	13800	MinB
13741	TACCGCTAAATCTAATCAATTTGTATACAACTACTAGTCATCAAAATATCATTAGTGCA7AA	13800	MinL
13741	TACCGCTAAATCTAATCAATTTGTATACAACTACTAGTCATCAAAATATCATTAGTGCA7AA	13800	MinFLC
	*** ** ***** ** ** * ** ** *;*****; ** ***** ***** **		
13801	TAGCACATCACTTTACTGCATGCTTCCTTGGCATCATATTAATAGATTCAAATTTGTATT	13860	RSV WT
13801	TAGCACATCACTTTACTGCATGCTTCCTTGGCATCATATTAATAGATTCAAATTTGTATT	13860	MinA
13801	TAGCACATCACTTTACTGCATGCTTCCTTGGCATCATATTAATAGATTCAAATTTGTATT	13860	MinB
13801	TAGTACTAGTCTATATTGTATGTTACCATGGCATCATATTAATAGATTCAAATTTCGTTTT	13860	MinL
13801	TAGTACTAGTCTATATTGTATGTTACCATGGCATCATATTAATAGATTCAAATTTCGTTTT	13860	MinFLC
	*** **; :**;* ** ** * ** *;***** ***** **;		
13861	TAGTCTACAGGTTGTAAAATTAGTATAGAGTATATTTAAAAGATCTTAAAATTAAGA	13920	RSV WT
13861	TAGTCTACAGGTTGTAAAATTAGTATAGAGTATATTTAAAAGATCTTAAAATTAAGA	13920	MinA
13861	TAGTCTACAGGTTGTAAAATTAGTATAGAGTATATTTAAAAGATCTTAAAATTAAGA	13920	MinB
13861	TAGTACTACAGGTTGTAAAATTAGTATAGAGTATATACTTAAAGATCTTAAAATTAAGA	13920	MinL
13861	TAGTACTACAGGTTGTAAAATTAGTATAGAGTATATACTTAAAGATCTTAAAATTAAGA	13920	MinFLC
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****		
13921	TCCTAATTTGATAGCAATTCATAGGTGAAGGAGCAGGGAAATTTATTATTGCSTACAGTAGT	13980	RSV WT
13921	TCCTAATTTGATAGCAATTCATAGGTGAAGGAGCAGGGAAATTTATTATTGCSTACAGTAGT	13980	MinA
13921	TCCTAATTTGATAGCAATTCATAGGTGAAGGAGCAGGGAAATTTATTATTGCSTACAGTAGT	13980	MinB
13921	TCCTAATTTGATTTGCATTCATAGGCGAAGGCGCAGGTAATCTGTTACTTAGAACAGTAGT	13980	MinL
13921	TCCTAATTTGATTTGCATTCATAGGCGAAGGCGCAGGTAATCTGTTACTTAGAACAGTAGT	13980	MinFLC
	*** *****;***** ***** ***** ** * ** * .;*****		
13981	GGAACTTCATCCTGCATAAGATATATTTACAGAGTCTGAAAGATTGCAATGATCATAG	14040	RSV WT
13981	GGAACTTCATCCTGCATAAGATATATTTACAGAGTCTGAAAGATTGCAATGATCATAG	14040	MinA
13981	GGAACTTCATCCTGCATAAGATATATTTACAGAGTCTGAAAGATTGCAATGATCATAG	14040	MinB
13981	CGAATTCATCCCGATATTAGATATATATATAGATCACTTAAAGATTGTAACGATCATAG	14040	MinL
13981	CGAATTCATCCCGATATTAGATATATATATAGATCACTTAAAGATTGTAACGATCATAG	14040	MinFLC
	*** * ***** ** **;*****;** **; :** ***** ** *****		
14041	TTTACCTATTGAGTTTTTAAGGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTATGGTGAJAA	14100	RSV WT
14041	TTTACCTATTGAGTTTTTAAGGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTATGGTGAJAA	14100	MinA
14041	TTTACCTATTGAGTTTTTAAGGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTATGGTGAJAA	14100	MinB
14041	TCTAACCAATCGAATTCCTTAGATTGTATAACGGTCATATAAACATAGATTACGGCGAJAA	14100	MinL
14041	TCTAACCAATCGAATTCCTTAGATTGTATAACGGTCATATAAACATAGATTACGGCGAJAA	14100	MinFLC
	* ** **; ** ** *; ** * ** * ** * ** *;***** ***** ***** **		
14101	TTTGACCAATTCCTGCTACAGATGCAACCAACAACATTCATTTGGTCTTATTTACATATAAA	14160	RSV WT
14101	TTTGACCAATTCCTGCTACAGATGCAACCAACAACATTCATTTGGTCTTATTTACATATAAA	14160	MinA
14101	TTTGACCAATTCCTGCTACAGATGCAACCAACAACATTCATTTGGTCTTATTTACATATAAA	14160	MinB
14101	CTTAACGATACCCGCTACTGACGGTACTAATAATATACATTTGGTCTACTTACATATTA	14160	MinL
14101	CTTAACGATACCCGCTACTGACGGTACTAATAATATACATTTGGTCTACTTACATATTA	14160	MinFLC
	** ** **; ** ** *****; ** ** * ** *;*****; ** *****; **		
14161	GTTTGTGAACTATCAGTCTTTTGTCTGTGATGCCGAATTTGCTGTAACAGTCAACTG	14220	RSV WT
14161	GTTTGTGAACTATCAGTCTTTTGTCTGTGATGCCGAATTTGCTGTAACAGTCAACTG	14220	MinA
14161	GTTTGTGAACTATCAGTCTTTTGTCTGTGATGCCGAATTTGCTGTAACAGTCAACTG	14220	MinB
14161	ATTCGCAAGACCTATAAGTCTAATTCGTATGCCAGCAGAAATTTCCGTPACAGTGAATG	14220	MinL
14161	ATTCGCAAGACCTATAAGTCTAATTCGTATGCCAGCAGAAATTTCCGTPACAGTGAATG	14220	MinFLC
	. ** **;***** *****; ** ** * ** * ** *;***** ** ***** ** **		
14221	GAGTAAAATTATAATAGAAATGGAGCAAGCATGTAAAGAAAGTCAAGTACTGTTCCCTCAGT	14280	RSV WT
14221	GAGTAAAATTATAATAGAAATGGAGCAAGCATGTAAAGAAAGTCAAGTACTGTTCCCTCAGT	14280	MinA
14221	GAGTAAAATTATAATAGAAATGGAGCAAGCATGTAAAGAAAGTCAAGTACTGTTCCCTCAGT	14280	MinB
14221	GTCTAAAATTATATCGAATGGTCTAAACACGTTAGAAAATGCAAAATTTGTTCTAGCGT	14280	MinL
14221	GTCTAAAATTATATCGAATGGTCTAAACACGTTAGAAAATGCAAAATTTGTTCTAGCGT	14280	MinFLC
	*; *****; ** *****; ** ** *;***** ***** ** ***** ; **		
14281	TAATAAATGTATGTTAATAGTAAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTTCAAATTAGA	14340	RSV WT
14281	TAATAAATGTATGTTAATAGTAAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTTCAAATTAGA	14340	MinA
14281	TAATAAATGTATGTTAATAGTAAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTTCAAATTAGA	14340	MinB
14281	TAATAAGTGTATGTTAATCGTTAAGTATCACGCTCAAGACGATATAGATTTTAAATTAGA	14340	MinL
14281	TAATAAGTGTATGTTAATCGTTAAGTATCACGCTCAAGACGATATAGATTTTAAATTAGA	14340	MinFLC
	***** *****; ** ***** ***** ***** ***** ***** *****		

Figura 7 (cont.)

14341 CAATATAACTATATATAAACTTATGTATGCTTAGGCAGTAAGTTAAAGGGATCGGAGGT 14400 RSV_WT
14341 CAATATAACTATATATAAACTTATGTATGCTTAGGCAGTAAGTTAAAGGGATCGGAGGT 14400 MinA
14341 CAATATAACTATATATAAACTTATGTATGCTTAGGCAGTAAGTTAAAGGGATCGGAGGT 14400 MinB
14341 TAATATAACTATACITAAAACATACGTATGCTTAGGTAGTAAAGTTAAAGGGATCGGAGGT 14400 MinL
14341 TAATATAACTATACITAAAACATACGTATGCTTAGGTAGTAAAGTTAAAGGGATCGGAGGT 14400 MinFLC
***** *:*****:***** ***** *:*****: **,**

14401 TTACTTAGTCCTTACAATAGGTCCTGCGAATATATCCAGTATTTAATGTAGTACAAAA 14460 RSV_WT
14401 TTACTTAGTCCTTACAATAGGTCCTGCGAATATATCCAGTATTTAATGTAGTACAAAA 14460 MinA
14401 TTACTTAGTCCTTACAATAGGTCCTGCGAATATATCCAGTATTTAATGTAGTACAAAA 14460 MinB
14401 ATACTTAGTGTAAACGATAGGTCAGCTAATATTTTCCCGTTTTTAAACGTAAGTACAAAA 14460 MinL
14401 ATACTTAGTGTAAACGATAGGTCAGCTAATATTTTCCCGTTTTTAAACGTAAGTACAAAA 14460 MinFLC
:***** *:**,******:** *****:** **,****** ***** **,**

14461 TGCTAAATTGATACTATCAAGAACCAAAAATTCATCATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGA 14520 RSV_WT
14461 TGCTAAATTGATACTATCAAGAACCAAAAATTCATCATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGA 14520 MinA
14461 TGCTAAATTGATACTATCAAGAACCAAAAATTCATCATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGA 14520 MinB
14461 CGCTAAATTGATTCATCTAGAACTAAAAATTTTATAATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGA 14520 MinL
14461 CGCTAAATTGATTCATCTAGAACTAAAAATTTTATAATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGA 14520 MinFLC
*****:*****:*****:***** ***** **,****** ***** **,**

14521 GTCTATTGATGCAAAATATTAAGGTTTGATACCCCTTCTTTGTTACCCCTATAACAAAAA 14580 RSV_WT
14521 GTCTATTGATGCAAAATATTAAGGTTTGATACCCCTTCTTTGTTACCCCTATAACAAAAA 14580 MinA
14521 GTCTATTGATGCAAAATATTAAGGTTTGATACCCCTTCTTTGTTACCCCTATAACAAAAA 14580 MinB
14521 GTCAAATGACCGTAATATAAAATCATTTGATACCACTTCTTATGTTATCCTATAACTAAGAA 14580 MinL
14521 GTCAAATGACCGTAATATAAAATCATTTGATACCACTTCTTATGTTATCCTATAACTAAGAA 14580 MinFLC
:** **,******:***: *****:** *:***** *****:**,**

14581 AGGAATTAATACTGCATTTGTCAAAACATAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATA 14640 RSV_WT
14581 AGGAATTAATACTGCATTTGTCAAAACATAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATA 14640 MinA
14581 AGGAATTAATACTGCATTTGTCAAAACATAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATA 14640 MinB
14581 AGGGATTAATACTGCATTTGTCAAAACATAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATA 14640 MinL
14581 AGGGATTAATACTGCATTTGTCAAAACATAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATA 14640 MinFLC
,*** ***** **,******:***: *****:** **,****** *****:**,**

14641 TTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTTTTTCAGCAATAAACTTATAAATCATRAGCATATGAA 14700 RSV_WT
14641 TTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTTTTTCAGCAATAAACTTATAAATCATRAGCATATGAA 14700 MinA
14641 TTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTTTTTCAGCAATAAACTTATAAATCATRAGCATATGAA 14700 MinB
14641 TAGTATAGCCGGTAGAAACGAAAGTTTTTAGTAAATAAATGATTAATCATAAACATATGAA 14700 MinL
14641 TAGTATAGCCGGTAGAAACGAAAGTTTTTAGTAAATAAATGATTAATCATAAACATATGAA 14700 MinFLC
*:***** **,****** **,****** **,****** **,****** **,****** **,******

14701 CATCTTAAATGGTTCATCATGTTTTAAATTTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAACCA 14760 RSV_WT
14701 CATCTTAAATGGTTCATCATGTTTTAAATTTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAACCA 14760 MinA
14701 CATCTTAAATGGTTCATCATGTTTTAAATTTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAACCA 14760 MinB
14701 TATACCTAAATGGTTCATCATGTTTTAAATTTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAACCA 14760 MinL
14701 TATACCTAAATGGTTCATCATGTTTTAAATTTTCAGATCAACAGAACTAAACTATAACCA 14760 MinFLC
,**** ***** **,****** **,****** **,****** **,****** **,****** **,******

14761 TTTATATATGGTGAATCTACATATCCTTACCTAAGTGAATGTTAAACAGCTTGACCAAC 14820 RSV_WT
14761 TTTATATATGGTGAATCTACATATCCTTACCTAAGTGAATGTTAAACAGCTTGACCAAC 14820 MinA
14761 TTTATATATGGTGAATCTACATATCCTTACCTAAGTGAATGTTAAACAGCTTGACCAAC 14820 MinB
14761 TCTATATATGGTGAATCTACATATCCTTACCTAAGTGAATGTTAAACAGCTTGACCAAC 14820 MinL
14761 TCTATATATGGTGAATCTACATATCCTTACCTAAGTGAATGTTAAACAGCTTGACCAAC 14820 MinFLC
* ***** **,****** **,****** **,****** **,****** **,****** **,******

14821 CAATGAACITAAAAAAGTATTAAAAATCACAGGTAGTCTGTTATACAACTTTCATAATGA 14880 RSV_WT
14821 CAATGAACITAAAAAAGTATTAAAAATCACAGGTAGTCTGTTATACAACTTTCATAATGA 14880 MinA
14821 CAATGAACITAAAAAAGTATTAAAAATCACAGGTAGTCTGTTATACAACTTTCATAATGA 14880 MinB
14821 TAACGAATTAAGAAATGATTAAAAATCACAGGTAGTCTGTTATACAACTTTCATAATGA 14880 MinL
14821 TAACGAATTAAGAAATGATTAAAAATCACAGGTAGTCTGTTATACAACTTTCATAATGA 14880 MinFLC
** ** ** * **,****** ***** **,****** **,****** **,****** **,****** **,******

14881 ATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAAAATCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAA 14940 RSV_WT
14881 ATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAAAATCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAA 14940 MinA
14881 ATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAAAATCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAA 14940 MinB
14881 ATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAAAATCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAA 14940 MinL
14881 ATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAAAATCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAA 14940 MinFLC

Figura 7 (cont.)

ES 2 952 387 T3

```
14941 TTATAGTTATTA AAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATAACTTTTAGTGAAC TAATC 15000 RSV_WT
14941 TTATAGTTATTA AAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATAACTTTTAGTGAAC TAATC 15000 MinA
14941 TTATAGTTATTA AAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATAACTTTTAGTGAAC TAATC 15000 MinB
14941 TTATAGTTATTA AAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATAACTTTTAGTGAAC TAATC 15000 MinL
14941 TTATAGTTATTA AAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATAACTTTTAGTGAAC TAATC 15000 MinFLC
*****
15001 CTAAAGTTATCATTTTAACTTTGGAGGAATAAATTTAAACCCCTAATCTAATGGGTTTATA 15060 RSV_WT
15001 CTAAAGTTATCATTTTAACTTTGGAGGAATAAATTTAAACCCCTAATCTAATGGGTTTATA 15060 MinA
15001 CTAAAGTTATCATTTTAACTTTGGAGGAATAAATTTAAACCCCTAATCTAATGGGTTTATA 15060 MinB
15001 CTAAAGTTATCATTTTAACTTTGGAGGAATAAATTTAAACCCCTAATCTAATGGGTTTATA 15060 MinL
15001 CTAAAGTTATCATTTTAACTTTGGAGGAATAAATTTAAACCCCTAATCTAATGGGTTTATA 15060 MinFLC
*****
15061 TGTGTATTAAC TAAATACGAGAYATTAGTTTTTGACACTTTTTTCTCGT 15111 RSV_WT
15061 TGTGTATTAAC TAAATACGAGAYATTAGTTTTTGACACTTTTTTCTCGT 15111 MinA
15061 TGTGTATTAAC TAAATACGAGAYATTAGTTTTTGACACTTTTTTCTCGT 15111 MinB
15061 TGTGTATTAAC TAAATACGAGAYATTAGTTTTTGACACTTTTTTCTCGT 15111 MinL
15061 TGTGTATTAAC TAAATACGAGAYATTAGTTTTTGACACTTTTTTCTCGT 15111 MinFLC
*****
```

Figura 7 (cont.)