



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 564**

51 Int. Cl.:

C12N 15/45 (2006.01)

C07K 14/115 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98926055 .9**

96 Fecha de presentación : **22.05.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0994949**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2000**

54 Título: **Producción de vacunas de virus parainfluenza atenuado a partir de secuencias de nucleótidos clonadas.**

30 Prioridad: **23.05.1997 US 47575 P**
19.09.1997 US 59385 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.07.2011

73 Titular/es: **The United States of America, as
Represented by the Secretary of the Department
of Health and Human Services
P.O. Box Ott
Bethesda, Maryland 20892, US**

72 Inventor/es: **Murphy, Brian, R.;
Collins, Peter, L.;
Durbin, Anna, P.;
Skiadopoulos, Mario, H. y
Tao, Tao**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

Producción de vacunas de virus parainfluenza atenuado a partir de secuencias de nucleótidos clonadas.

5 Antecedentes de la invención

[0001] Los virus parainfluenza humanos (HPIV), HPIV1, HPIV2 y HPIV3, son causas significativas de bronquiolitis, difteria y neumonía en lactantes y niños. Karron et al., J. Infect. Dis. 172: 1445-50 (1995); Collins et al. "Parainfluenza Viruses", págs. 1205-1243. En B.N. Fields et al., eds., Fields Virology, 3ª ed, vol. 1. Lippincott-Raven Publ., Filadelfia (1996); Murphy et al., Virus Res. 11: 1-15 (1988). Las infecciones por estos virus dan como resultado una morbilidad importante en niños menores de 3 años de edad y son responsables de aproximadamente el 20% de las hospitalizaciones entre lactantes y niños pequeños por infecciones del tracto respiratorio.

[0002] A pesar de los considerables esfuerzos por desarrollar terapias vacunales eficaces contra HPIV, no se han logrado todavía agentes vacunales autorizados para ninguna cepa de HPIV, ni para mejorar enfermedades relacionadas con HPIV. Hasta la fecha sólo dos candidatos a vacunas de PIV vivas atenuadas han recibido una atención particular. Uno de estos candidatos es una cepa de PIV bovino (BPIV) que está antigénicamente relacionada con el HPIV3, y que ha demostrado proteger a los animales frente al HPIV3. El BPIV3 está atenuado, es genéticamente estable e inmunogénico en lactantes y niños humanos (Karron et al., J. Inf. Dis. 171: 1107-14 (1995a); Karron et al., J. Inf. Dis. 172: 1445-1450, (1995b)). Un segundo candidato a vacuna de PIV3, JS *cp45* es un mutante adaptado al frío de la cepa de tipo silvestre (wt) JS del HPIV3 (Karron et al., (1995b), anteriormente; Belshe et al., J. Med. Virol. 10: 235-42 (1982)). Este candidato a vacuna de PIV3 viva atenuada pasada en frío (*cp*) presenta fenotipos termosensibles (*ts*), de adaptación al frío (*ca*) y de atenuación (*att*) que son estables después de la replicación viral *in vivo*. El virus *cp45* protege frente a la exposición a PIV3 humano en animales de experimentación y está atenuado, es genéticamente estable e inmunogénico en lactantes y niños humanos seronegativos (Hall et al., Virus Res. 22: 173-184 (1992); Karron et al., (1995b), anteriormente).

[0003] El HPIV3 es un miembro del género Paramyxovirus de la familia Paramyxovirus, orden Mononegavirales. Su genoma es una sola cadena de ARN de sentido negativo de 15462 nucleótidos (nt) de longitud (Galinski et al., Virology 165: 499-510, (1988); Stokes et al., Virus Res. 25: 91-103 (1992)) y codifica al menos ocho proteínas (Collins et al., anteriormente, (1996); Galinski, anteriormente, (1991); Spriggs y Collins, J. Gen. Virol. 67: 2705-2719, (1986)). Tres de estas proteínas se asocian con el genoma de ARN para formar la nucleocápside; en concreto, la proteína de la nucleocápside N, la fosfoproteína P y la subunidad grande de la polimerasa L. Tres proteínas adicionales se asocian con la envuelta, en concreto la proteína de la matriz M, que ha demostrado mediar la unión y la liberación viral, la proteína hemaglutinina-neuraminidasa HN y la proteína de fusión F. Otras dos proteínas, HN y F, representan los antígenos neutralizantes y protectores de los PIV (Collins et al. En Fields Virology, 3ª ed., 1: 1205-43 (1996)). La divergencia de secuencia significativa en estos dos antígenos protectores entre diferentes PIV es la base para la especificidad de inmunidad protectora tipo contra estos patógenos (*idem*).

[0004] Otra proteína de PIV, la proteína C, está codificada por una fase de lectura abierta (ORF) solapante del ARNm de la proteína P (Spriggs y Collings, 1986) y la proteína D se genera por edición del ARN del cistron P (Galinski et al. Virology 186: 543-50 (1992)). El ARNm de P también contiene una ORF interna que tiene el potencial de codificar un dominio rico en cisteína denominado V. La ORF V también se encuentra en otros paramixovirus y, típicamente, se accede a la misma por edición del ARN, pero éste no es el caso del PIV. Actualmente, no se sabe si se expresa la ORF V del PIV.

[0005] El genoma viral de PIV también contiene regiones líder y tráiler extragénicas, que poseen promotores necesarios para la replicación y transcripción viral. Por lo tanto, el mapa genético del PIV está representado como 3' Líder-N-P/C/D-M-F-HN-L-tráiler. La transcripción se inicia en el extremo 3' y avanza mediante un mecanismo de terminación-inicio secuencial que está guiado por motivos conservados cortos que se encuentran en los límites de los genes. El extremo cadena arriba de cada gen contiene una señal de inicio de gen (GS), que dirige el inicio de su ARNm respectivo. El extremo terminal cadena abajo de cada gen contiene un motivo de final de gen (GE) que dirige la poliadenilación y la terminación.

[0006] La identificación de mutaciones atenuantes en *cp45* y otros candidatos a vacunas de PIV3 es de interés por una diversidad de razones (documento WO 97 20468 A). En particular, será útil para comprender la base genética de la atenuación y para caracterizar la virología molecular y la patogénesis de cepas de HPIV3 atenuadas para proporcionar vacunas clínicamente aceptables para usar contra estos y otros paramixovirus, especialmente HPIV1 y HPIV2, que en conjunto representan un 7% adicional de los ingresos hospitalarios pediátricos. Para conseguir estos objetivos y objetivos relacionados, es necesario un método para producir virus con un fenotipo wt a partir de ADNc para determinar qué mutación o mutaciones en el virus *cp45* especifican los fenotipos *ts*, *ca* y *att* y qué gen o genes del BPIV3 especifican el fenotipo de atenuación.

[0007] Las secuencias de nucleótidos completas de la cepa de PIV3 prototipo, y de las cepas *cp45* y HPIV3 JS wt

- se han determinado (Stokes et al., anteriormente, (1992); Stokes et al., Virus res. 30: 43-52 (1993)). A partir de estos estudios, se demostró que la cepa *cp45* poseía al menos diecisiete sustituciones de nucleótidos en comparación con la cepa de HPIV3 JS wt parental, estando ocho de las mismas correlacionadas con cambios en proteínas virales. Sin embargo, no se ha mostrado previamente cuáles de estas mutaciones identificadas especifican los fenotipos
- 5 deseados, por ejemplo, *ts*, *ca* y *att*. Recientemente, se describió que el crecimiento de *cp45* a temperaturas no permisivas estaba complementado por la coexpresión de un clon de ADNc del gen de L de la cepa de PIV3 wt 47885 (Ray et al., J. Virol. 70: 580-584 (1996)), sugiriendo que el gen de L puede contener una o más mutaciones que contribuyen al fenotipo *ts* de *cp45*. Sin embargo, los resultados de este estudio se complican por el hecho de que la cepa 47885 no es isogénica con la parental JS de *cp45* (por ejemplo, los dos virus son un 4% diferentes a nivel de
- 10 nucleótidos y las proteínas L difieren en 41 posiciones de aminoácidos (Stokes et al., anteriormente, (1992); la fe de erratas aparece en Virus Res. 27: 96 (1993); Virus Res. 25: 91-103). Además, este método de complementación no proporciona una medición clara de la contribución relativa de la mutación o mutaciones del gen de L al fenotipo *ts* global de *cp45*.
- 15 **[0008]** El rescate y el análisis de mutaciones atenuantes en PIV3 y otros virus ARN requieren métodos eficaces para manipular ADNc para los virus de interés particulares. A pesar de los avances previos que identificaban ADNc para PIV, la manipulación del ARN genómico de este y otros virus ARN de sentido negativo ha demostrado ser difícil. Un obstáculo principal a este respecto es que el ARN genómico desnudo de estos virus no es infeccioso.
- 20 **[0009]** Sólo recientemente han comenzado a desarrollarse métodos exitosos para la manipulación genética directa de virus ARN de cadena negativa no segmentada (para revisiones, véase Conzelmann, J. Gen. Virol. 77: 381-89 (1996); Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 11354-58, (1996)) (véase también el documento EP 0 702 085 A y EP 0 440 219 A). Se han generado con éxito nucleocápsides funcionales a partir de la coexpresión intracelular de plásmidos transfectados por separado que llevan el promotor de la ARN polimerasa de T7 y que codifican ARN
- 25 genómico o antígeno genómico y las proteínas N, P y L. La expresión de ADNc intracelular se dirige mediante ARN polimerasa de T7, que se produce por coinfección con un virus vaccinia recombinante. Esta estrategia se usó por primera vez para determinar las necesidades de transcripción y replicación de minirreplicones codificados por ADNc. Se han conseguido algunos éxitos en la aplicación de estos métodos generales para rescatar virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus del sarampión y virus Sendai infecciosos a partir de ARN antígeno genómico
- 30 codificado por ADNc en presencia de la nucleocápside N, la fosfoproteína P y la subunidad grande de la polimerasa L (Garcin et al., EMBO J. 14: 6087-6094 (1995); Lawson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 4477-81 (1995); Radecke et al., EMBO J. 14: 5773-5784 (1995); Schnell et al., EMBO J. 13: 4195-203 (1993); Whelan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 8388-92 (1995)). También se ha recuperado virus respiratorio sincitial (RSV) a partir de antígeno genómico codificado por ADNc, pero esto requería la transfección de un plásmido adicional que codifica el factor
- 35 de elongación de la transcripción ORF 1 M2 (Collins et al., 1995).
- [0010]** El rescate de virus PIV infeccioso y otros miembros de los Mononegavirales es complicado en virtud de su genoma de ARN de cadena negativa no segmentada. Los complejos genómicos de ribonucleoproteínas (RNP) de virus de genoma segmentado, tales como influenza, son generalmente de pequeño tamaño y están laxamente
- 40 estructurados, y pueden ensamblarse *in vitro* a partir de ARN y de las proteínas virales necesarias. Sin embargo, el PIV y otros miembros de los Mononegavirales presentan RNP mucho mayores y más estrechamente estructuradas, que tienden a ser refractarias a la asociación funcional *in vitro*. Además, el potencial codificante de ARNm de P de HPIV3 se complica por la "edición de ARN" cotranscripcional (Galinski et al., Virology 186: 543-50 (1992)). Los desplazamientos resultantes en la fase de lectura pueden acceder a las ORF internas que se expresan como
- 45 quimeras fusionadas a la parte N-terminal de P. Además, el HPIV3 parece diferir de la mayoría de los demás paramixovirus que expresan una proteína V quimérica, como se ha señalado anteriormente. El conjunto de proteínas correspondiente de la edición del HPIV3 no se ha identificado todavía y la ORF V interna del HPIV3 está separada del sitio de edición por numerosos codones de terminación de la traducción (Galinski et al. (1992, anteriormente)). Otro factor de complicación más es que la edición por BPIV3 y HPIV3 produce una nueva proteína quimérica D, en
- 50 la que se fusiona la mitad cadena arriba de P a un dominio codificado por una segunda ORF interna (Pelet et al., EMBO J. 10: 443-448 (1991); Galinski et al., anteriormente, (1992)). La proteína D no tiene un homólogo en otros paramixovirus. En vista de lo anterior, existe en la técnica la necesidad urgente de herramientas y métodos para fabricar vacunas seguras y eficaces para aliviar los graves problemas de salud atribuibles al PIV, particularmente enfermedades entre niños y lactantes atribuibles al HPIV3. Bastante sorprendentemente, la presente invención
- 55 cumple estas y otras necesidades relacionadas.

Descripción resumida de la invención

- [0011]** La presente invención proporciona nuevas herramientas y métodos para introducir cambios fenotípicos y
- 60 estructurales predeterminados definidos en PIV infecciosos. De acuerdo con la invención, se proporciona una molécula polinucleotídica aislada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un promotor de la transcripción unido operativamente, una secuencia polinucleotídica que codifica un genoma o antígeno genómico de PIV y un terminador de la transcripción.

[0012] El genoma o antigenoma de PIV es una versión modificada recombinantemente de la secuencia de PIV3 humano. En una realización, la secuencia polinucleotídica codifica un genoma o antigenoma quimérico que comprende una secuencia de PIV3 humano unida recombinantemente con una secuencia de PIV bovino, tal como un gen o segmento génico del PIV bovino (BPIV). En ejemplos adicionales, el polinucleótido de la invención codifica una quimera de secuencias de PIV3 humano y al menos otro PIV de origen humano o bovino.

[0013] En otras realizaciones, la invención proporciona una partícula de PIV infecciosa aislada que comprende un genoma o antigenoma de PIV recombinante (rPIV), una proteína N, una proteína P y una proteína L. La partícula de PIV infecciosa aislada puede ser una partícula viral o subviral. Como se usa en la presente memoria, la partícula subviral se refiere a cualquier partícula de PIV infecciosa que carece de un elemento estructural, por ejemplo, un segmento génico, gen, proteína o dominio funcional de proteína, que está presente en un virus completo (por ejemplo, un virión ensamblado, incluyendo un genoma o antigenoma completo, nucleocápside y envuelta). Por lo tanto, un ejemplo de una partícula subviral de la invención es una nucleocápside infecciosa que contiene un genoma o antigenoma, y los productos de los genes de N, P y L. Otras partículas subvirales se producen por deleciones o sustituciones parciales o completas de genes no esenciales y/o sus productos (por ejemplo, F, HN, M o C), entre otros elementos estructurales no esenciales.

[0014] La partícula de PIV infecciosa aislada comprende secuencias quiméricas a partir de dos o más genomas de PIV diferentes e incorpora secuencias polinucleotídicas de HPIV3 y HPIV1, secuencias de HPIV3 y HPIV2, o está compuesta por secuencias de HPIV3 y BPIV.

[0015] En aspectos de la invención relacionados, se proporcionan partículas de PIV infecciosas aisladas que incorporan secuencias de nucleótidos de HPIV3 unidas a al menos una secuencia de un PIV heterólogo, tal como HPIV1, HPIV2 o BPIV. Por ejemplo, los genes completos de HPIV3 pueden sustituirse por genes homólogos de otras formas de PIV, tales como los genes de glicoproteína HN y/o F de PIV1 o PIV2. Los genes de segmentos génicos de un PIV pueden añadirse (es decir, sin sustitución) dentro de un fondo de PIV heterólogo para crear nuevas propiedades inmunogénicas dentro del clon resultante.

[0016] Otras modificaciones pueden producirse introduciendo en el genoma o antigenoma de HPIV3 una inserción, reorganización, delección o sustitución de nucleótidos seleccionada para codificar una alteración fenotípica deseada, tal como una que dé como resultado la atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador, crecimiento *in vitro* mejorado o un cambio en un epítipo inmunogénico de PIV. En un aspecto de la invención, se identifican mutaciones que aparecen en PIV atenuados derivados biológicamente y se introducen individualmente o en combinación en un clon de PIV de longitud completa. Típicamente, estas mutaciones son cambios de un solo aminoácido presentados por virus mutantes derivados biológicamente sobre un PIV de tipo silvestre, por ejemplo cambios presentados por mutantes de PIV que tienen fenotipos *ts*, *ca* o *att*. Estos cambios de PIV mutantes derivados biológicamente se incorporan en un clon de PIV recombinante para especificar las características deseadas en el virus resultante. Las mutaciones ejemplares incluyen cambios de aminoácido que especifican un fenotipo atenuado en la cepa JS *cp45* de HPIV3. Entre estas mutaciones ejemplares están mutaciones que aparecen dentro del gen L de la polimerasa de PIV que especifican fenotipos *ts*, *ca* o *att*, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos que aparecen en Tyr₉₄₂, Leu₉₉₂ y/o Thr₁₅₅₈ de la cepa de PIV de tipo silvestre JS. En aspectos más detallados, se describen PIV recombinantes atenuados en los que Tyr₉₄₂ se sustituye por His, Leu₉₉₂ se sustituye por Phe, y/o Thr₁₅₅₈ se sustituye por Ile.

[0017] También se proporcionan en la invención PIV recombinantes que tienen múltiples mutaciones especificantes de fenotipo introducidas en combinaciones seleccionadas en el genoma o antigenoma de un clon infeccioso para dar las características deseadas, incluyendo atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador, etc. Por ejemplo, se proporcionan clones de PIV que incorporan al menos dos mutaciones separadas adoptadas de un mutante de PIV derivado biológicamente, por ejemplo, dos mutaciones de *ts* de HPIV3 JS *cp45*. Se obtienen de este modo múltiples virus atenuados seleccionando mutaciones de un “menú” de lesiones identificadas e introduciendo estas mutaciones en diversas combinaciones para calibrar un virus vacunal a niveles de atenuación, inmunogenicidad y estabilidad seleccionados.

[0018] En realizaciones adicionales, la invención proporciona la complementación de una o más mutaciones adaptadas a partir de PIV derivados biológicamente, por ejemplo, mutaciones *ts*, *ca* o *att*, con tipos de mutaciones adicionales que implican el mismo o diferentes genes. Los genes diana para mutación en este contexto incluyen la proteína de la nucleocápside N, la fosfoproteína P, la subunidad grande de la polimerasa L, la proteína de la matriz M, la proteína hemaglutinina-neuraminidasa HN, la proteína de fusión F y los productos de las ORF, C, D y V. En aspectos preferidos, se incorporan mutaciones atenuantes adoptadas de PIV derivados biológicamente dentro de un PIV quimérico recombinante, por ejemplo, un PIV recombinante que tiene secuencias de nucleótidos tanto de HPIV3 como de HPIV1, o de virus tanto HPIV como BPIV.

[0019] En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para producir una partícula de PIV infecciosa, por

ejemplo, una partícula viral o subviral, a partir de una o más moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican un genoma o antígeno de PIV (véase también la solicitud provisional de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente N° 60/047474, presentada el 23 de mayo de 1997).

- 5 **[0020]** Para producir una partícula de PIV infecciosa de acuerdo con estos métodos, se coexpresa un vector de expresión que comprende una molécula polinucleotídica aislada que codifica un genoma o antígeno de PIV en una célula o sistemas sin células con un vector de expresión que comprende una o más moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican proteínas N, P y L de un PIV, por lo que se produce una partícula de PIV infecciosa.
- 10 **[0021]** El genoma o antígeno de PIV y las proteínas N, P y L pueden coexpresarse mediante un solo vector de expresión o mediante vectores de expresión separados. En realizaciones alternativas, las proteínas N, P y L están cada una codificadas en vectores de expresión separados.

- [0022]** Dentro de los métodos mencionados anteriormente, la molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de PIV corresponde a una secuencia genómica o antigenómica de PIV3 humano. Como alternativa, el polinucleótido codificante de PIV puede ser una quimera de una secuencia genómica o antigenómica de PIV3 humano, y la secuencia genómica o antigenómica de PIV no humano, BPIV. En métodos adicionales para producir PIV infecciosos, el polinucleótido que codifica el genoma o antígeno de PIV es una quimera de dos o más genomas de PIV humano, es decir, un polinucleótido que contiene secuencias de HPIV3 unidas a secuencias de una o más formas relacionadas de PIV humano, tales como PIV1 humano o PIV2 humano. Pueden sustituirse genes individuales de PIV3 humano por genes homólogos de PIV heterólogo, por ejemplo, los genes de glicoproteína HN y F de PIV1 o PIV2, para dar un genoma o antígeno modificado que codifique un PIV quimérico.
- 15 **[0023]** En otros métodos adicionales para producir PIV infecciosos, el genoma o antígeno de PIV se modifica para dar una quimera de una secuencia genómica o antigenómica de PIV humano y al menos una secuencia de PIV no humano, por ejemplo, un polinucleótido que contiene secuencias de PIV tanto humano como bovino.
- 20 **[0024]** En otros métodos para producir PIV infeccioso, el genoma o antígeno de PIV se modifica por una inserción, reorganización, delección o sustitución de nucleótidos seleccionada para codificar una alteración fenotípica deseable, tal como una que dé como resultado la atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador o un cambio en un epítipo inmunogénico de PIV. Como alternativa, la molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de PIV puede modificarse para codificar moléculas distintas de PIV, por ejemplo, una citocina, un epítipo T auxiliar, un marcador de sitio de restricción o una proteína de un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria u hongo) capaz de
- 30 generar una respuesta inmune protectora en el hospedador deseado. En una realización, el genoma o antígeno de PIV se modifica para codificar una proteína de un RSV humano o del virus del sarampión.

- [0025]** En otras realizaciones de la invención, se proporciona una célula o sistema de expresión sin células (por ejemplo, un lisado sin células) que incorpora un vector de expresión que comprende una molécula polinucleotídica aislada que codifica un genoma o antígeno de PIV, y un vector de expresión que comprende una o más moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican las proteínas N, P y L de un PIV. Tras la expresión, el genoma o antígeno y las proteínas N, P y L se combinan para producir una partícula de PIV infecciosa, tal como una partícula viral o subviral. Las moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican el genoma o antígeno de PIV y la una o más moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican las proteínas N, P y L de PIV pueden expresarse mediante un solo vector, o el genoma y una o más de las proteínas N, P y L pueden incorporarse en dos o más vectores separados.
- 40 **[0026]**
- 45

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 ilustra la construcción del plásmido p218(131), que codifica una copia completa de ARN genómico de HPIV3. El diagrama de p218(A*A'CC'D'E) (parte superior izquierda) ilustra la localización del terminador de T7 y de la ribozima de delta adyacente al nucleótido 1 del genoma de HPIV3. El diagrama de la parte superior derecha de p(E*FF'GHIJKL*) ilustra las localizaciones de los 7 marcadores de secuenciación (asterisco), véase la Fig. 2 a continuación, y el promotor de T7 adyacente al nucleótido 15462 de HPIV3. Los 15 clones solapantes usados para construir el ADNc genómico de longitud completa se indican mediante letras en el exterior de los dos plásmidos. Los sitios de restricción únicos *Ngo*M y *Xho*I se usaron para clonar el p218(131) que codifica el ARN genómico de sentido negativo completo de HPIV3 ilustrado en la parte inferior. La localización de cada marcador de secuenciación en p218(131) que diferencia el JS recombinante del JS wt se indica mediante un asterisco.
- 50
- 55
- 60

La Figura de referencia 2 representa marcadores de secuencia en el ARN genómico codificado por ADNc de los

genes HN (1) y L(2) de HPIV3. Las secuencias son de sentido negativo, las mutaciones están recuadradas.

1) Una sustitución de nucleótido no codificante en 7903 elimina un sitio *Hga* I de JS wt. Las sustituciones nucleótidos en el ADNc de JS en 7913 y 7915 crean un sitio *Sca* I y cambian el aminoácido 370 de prolina a treonina, suprimiendo el epítipo de anticuerpo reconocido por los mAb 170/7 y 423/6. Además, se descubrió que el gen de HN contenía una mutación puntual adicional en el nucleótido 7593 que no se había reconocido anteriormente. Esto da como resultado un cambio de treonina a isoleucina en la posición aminoácida 263 en la proteína HN.

2) Las tres mutaciones no codificantes accidentales en el gen de L del ADNc de JS que aparecían durante la construcción o el ensamblaje del plásmido están recuadradas.

La Figura de referencia 3 incluye un diagrama (no a escala) del ADNc de PIV3-CAT (parte superior, dibujado como un plásmido circular) y el ARN de minigenoma codificado (parte inferior, dibujado como una sola cadena de ARN de sentido negativo, de 3' a 5').

Plásmido: El promotor de T7 se muestra como una flecha negra que señala en la dirección de la transcripción. Se muestran las posiciones para la ribozima de delta, el terminador de la transcripción de T7, los terminadores de la transcripción de virus vaccinia insertados (T₇CT y T₅AT), sitios de enzimas de restricción y la secuencia codificante de los diversos dominios del minigenoma codificado.

ARN de minigenoma: El extremo 5' (a la derecha) del minigenoma está definido por el promotor para la ARN polimerasa de T7, que contribuye a una extensión de dos restos G no virales. Éstos no se incluyen en los cálculos de la longitud. El extremo 3' está definido por la ribozima y está libre de cualquier nucleótido heterólogo. Se muestran las regiones específicas de PIV3 como recuadros en blanco. La ORF de CAT está sombreada y se muestran las complementarias de sentido negativo de los codones de inicio (UAC) y terminación (AUU) de la traducción. Las posiciones de nucleótidos se indican de acuerdo con el minigenoma de 898 nucleótidos más corto. Las longitudes de nucleótidos de regiones específicas se proporcionan entre paréntesis. La secuencia de las posiciones 90 a 124 (3' a 5', sentido negativo) se muestra en la parte inferior; la secuencia específica de PIV3 está subrayada, la complementaria de un terminador de la transcripción de virus vaccinia está subrayada por encima, la complementaria del sitio *Xba*I está en cursiva y la complementaria del codón de inicio de la traducción para la ORF de CAT está en negrita. El sitio en el que se insertaron de 0 a 6 restos G, dando como resultado PIV3-CAT 0 a +6, está indicado. Abreviaturas: GS, motivo transcripcional del inicio del gen; GE, motivo transcripcional del final del gen/poliadenilación; NT, secuencia génica no traducida.

La Figura de referencia 4 representa la expresión de la enzima CAT por minigenomas PIV3-CAT 0 a +6. Las células se transfectaron con plásmidos que codifican el minigenoma de PIV3-CAT indicado y las proteínas N, P y L, y se infectaron simultáneamente con virus vaccinia recombinante vTF7-3 que expresaba la ARN polimerasa de T7. Los lisados se prepararon 48 h post-infección y se analizaron muestras que representan 3000 células para determinar la actividad de CAT. Las actividades se expresan respecto al minigenoma +2, que es un múltiplo de seis, como 100. Las muestras en las que se omitió el plásmido L no tenían actividad de CAT detectable en estas condiciones.

Las Figuras de referencia 5a y 5B representan la síntesis de ARN miniantigenómico por minigenomas de PIV3-CAT 0 a +6. Las células se transfectaron e infectaron como se ha descrito para la Fig. 4, excepto para los controles en los que se omitió el plásmido N (carril 1) o plásmido L (carril 2). El plásmido de minigenoma de PIV3-CAT que se transfectó en cada caso está indicado. Se prepararon lisados celulares a las 48 h post-transfección: se trató una alícuota con nucleasa microcócica (tratada) y en la segunda se realizó un tratamiento simulado (no tratada), seguido de procesamiento para purificación de ARN. Los ARN se analizaron mediante hibridación de transferencia de Northern con una ribsonda de CAT de sentido negativo. Como marcador y control para el tratamiento con nucleasa, el minigenoma de RSV-CAT C2 (Grosfeld et al., J. Virol. 69: 5677-5686 (1995)) se complementó mediante las proteínas N, P y L de RSV y se procesó en paralelo (carril 10). Se muestran autorradiogramas de las transferencias hibridadas en la Fig. 5A. La Fig. 5B muestra un análisis de Phosphorimager en el que la cantidad de hibridación relativa al minigenoma +2 se calculaba por separado para las muestras tratadas y no tratadas.

Las Figuras de referencia 6A y 6B representan la síntesis de ARNm poliadenilado por minigenomas de PIV3-CAT de 0 a +6. Usando alícuotas de células del mismo experimento que se muestra en las Figs. 5A y 5B, se recogió el ARN intracelular total a las 48 h post-transfección y se fraccionó mediante cromatografía de oligo(dT) en fracciones de unido y no unido, que se analizaron mediante hibridación de transferencia de Northern con una ribsonda de CAT de sentido negativo. La Fig. 6A muestra autorradiogramas de las transferencias hibridadas. La Fig. 6B muestra el análisis de Phosphorimager en el que la cantidad de hibridación se normalizó respecto a la fracción de ARN unido del minigenoma +2, esto se calculó por separado para las fracciones de unido y no unido.

Las Figuras de referencia 7A y 7B representan la acumulación de minigenoma intracelular en respuesta a plásmido que codifica minigenomas de PIV3-CAT 0 a +6. Esto es una continuación del experimento mostrado en las Figs. 5A y 5B. Por lo tanto, las células que se habían transfectado con plásmidos que codifican un minigenoma y las proteínas N, P y L, e infectadas con vTF7-3, se recogieron 48 h post-transfección y se prepararon lisados celulares. Se trató una alícuota de lisado con nucleasa microcócica (tratada) y en la otra se realizó un tratamiento simulado (no tratada), seguido de procesamiento para purificación de ARN. Los ARN se analizaron mediante hibridación de transferencia de Northern con una ribsonda de CTA de sentido positivo, mientras que en la Fig. 5A la ribsonda era de sentido negativo. La Fig. 7A muestra autorradiogramas de las transferencias hibridadas. La Fig. 7B muestra un análisis de Phosphorimager en el que la cantidad de hibridación respecto al minigenoma +2 se calculaba por separado para las muestras tratadas y no tratadas.

Las Figuras 8-10 ilustran la construcción de p3/7(131)2G. El p3/7(131)2G codifica un antígenoma de HPIV3 de sentido positivo completo y contiene dos restos G entre el promotor de T7 y el nucleótido 1 del antígenoma. La construcción implicaba la modificación por separado de las mitades izquierda y derecha del ADNc 218(131) que codifica el genoma de sentido negativo. Usando la misma estrategia, se construyó un segundo ADNc, p3/7(131), que es idéntico a p3/7(131)2G excepto por que se omitieron los dos restos G.

La Figura 8 representa la construcción de p(Left+2G), realizada por sustitución de la ribozima y del terminador de la transcripción de T7 de p218(A*A'CC'D'E) con un promotor de T7 que incluía dos restos G. El p218 (A*A'CC'D'E) se usó como molde en una PCR que amplificaba los 1224 nucleótidos a la izquierda del genoma de HPIV3 (rectángulo en negro marcado como "PIV3seq.") usando un cebador de PCR a la izquierda que introducía el promotor de T7. Este fragmento de PCR se clonó en la ventana MluI-PmlI de p218(A*A'CC'D'E), dando como resultado el p(Left+2G).

La Figura 9 representa la construcción de p(Right+), realizada por sustitución del promotor de T7 de p(E*FF'GHIHKL*) con una ribozima y el terminador de T7 situados adyacentes al nucleótido 15642 de PIV3 en la cadena de sentido positivo (antígenoma). Se usó el p(E*FF'GHIHKL*) como molde en una PCR que amplificaba los 649 nucleótidos a la derecha del genoma de HPIV3 (rectángulo en negro marcado como "PIV3seq.") usando un oligonucleótido mutagénico que añadía parte de la ribozima de delta (incluyendo un sitio RsrII de origen natural). Este producto de PCR se clonó en la ventana RsrII-BssHII de p3/7 para dar el pPIV3-3/7, reconstruyendo de este modo una ribozima completa flanqueada por el terminador de T7. El fragmento Swal-NgoMI de pPIV3-3/7 se clonó en las ventanas Swal-NgoMI de p(E*FF'GHIHKL*), dando como resultado el p(Right+). Las localizaciones de los siete marcadores de secuencia están indicadas con asteriscos.

La Figura 10 representa la construcción de p3/7(131)2G. El fragmento NgoMI-XhoI de p(Right+) se clonó en la ventana NgoMI-XhoI de p(Left+2G), dando como resultado el p3/7(131)2G. Las posiciones de los genes de HPIV3 se indican (no a escala). Las localizaciones de los marcadores de secuencia se indican con asteriscos.

La Figura 11 muestra la confirmación de secuencia de un PIV3 recombinante de sentido negativo. Se generó un fragmento de 1379 pb (nucleótidos 7334-8713) que abarcaba las mutaciones en las posiciones 7903, 7913 y 7915 mediante RT-PCR de ARN de células infectadas, y después se analizó mediante secuenciación cíclica. Las mutaciones que diferenciaban el PIV recombinante del JS wt se indican mediante flechas. La secuencia completa del nucleótido 7897 al 7922 se muestra en el margen al lado de cada gel, indicándose las tres diferencias de nucleótidos en negrita.

La Figura 12 proporciona un mapa del plásmido pTM(L)942/992/1558, que contiene el ADNc de L de PIV3 con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 942, 992 y 1558 en la secuencia proteica de L. La posición relativa de cada cambio de codificación se indica junto con la diferencia de aminoácido y el sitio de restricción de origen natural que se suprimía deliberadamente como marcador. Los sitios de restricción usados para la clonación (*SphI*, *PstI*, *BamHI* y *NheI*) se indican. La flecha muestra la dirección de la secuencia codificante de proteína L y se numera de acuerdo con la posición de aminoácido.

La Figura 13 es una representación esquemática de virus PIV3 recombinantes que llevan mutaciones representativas dentro de la invención.

Las Figuras 14A y 15B ilustran la construcción de ADNc que codifica el antígenoma de PIV3-PIV1 quimérico, en el que las ORF F y HN de PIV3 se sustituyen por las de PIV1. En primer lugar (partiendo de la parte inferior izquierda) los genes de HN y F de PIV3 se subclonaron (como fragmentos *BspE*-I-*Xho*I y *EcoR*I-*Spe*I) a partir del clon de ADNc de PIV3 de longitud completa p3/7 (131) 2G (panel A) para generar pLit.PIV3.F3a y pLit.PIV3.HN4 (panel B), respectivamente. Se realizó mutagénesis por PCR (Panel C) para delecionar las regiones codificantes completas de los genes de HN y F de PIV3 e introducir nuevos sitios de restricción (recuadrados). Se prepararon ADNc de HN y F de PIV1 a partir de ARN de células infectadas mediante RT-PCR y se clonaron en pLITMUS28 (Panel D). Estos clones, pLit.1Fwt y pLit.1HNwt, se usaron como moldes para la

modificación de los genes de HN y F de PIV1 en sus codones de inicio y terminación para introducir nuevos sitios de restricción compatibles con los introducidos en las delecciones de PIV3 (Panel E). Se construyeron genes de HN y F quiméricos importando las regiones codificantes de PIV1 en las delecciones de PIV3 para generar el pLit.PIV3-1.Fhc y pLit.PIV3-1.HNhc (Panel F). El F y HN quiméricos se ensamblaron juntos para generar el pSE.PIV3-1.hc (Panel G). El segmento quimérico de F y HN se introdujo en el clon de PIV3 de longitud completa p3/7(131)2G sustituyendo su fragmento *BspE* I-*Sph* I para generar el pFLC.2G+.hc (Panel H). Los pequeños recuadros entre genes representan las regiones del final del gen, intergénica y del inicio del gen, y las líneas representan las regiones no codificantes. Las porciones sombreadas son de PIV1, los recuadros en blanco son de PIV3. Las flechas negras representan el promotor de T7, mientras que los recuadros negros representan la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV).

La Figura 15A es un diagrama de los genes F y HN quiméricos del rPIV3-1 quimérico (mitad) en paralelo con los de rPIV3/JS (parte superior; denominado alternativamente en la presente memoria rJS y rPIV3 JS wt) y PIV1/Wash64 (parte inferior). Las cuatro regiones de unión que contenían las transiciones de secuencia de PIV3 a PIV1 están recuadradas y numeradas de I a IV. Cada recuadro pequeño entre genes representa la región del final del gen, intergénica y del inicio del gen, y las líneas representan las regiones no codificantes. Se representan como flechas los cebadores de RT-PCR específicos para los genes de L y M de PIV3 (pareja de cebadores A en la parte superior) o específicos para los genes de HN y M de PIV1 (pareja de cebadores B en la parte inferior) usados en las Figuras 14A y 14B.

La Figura 15B muestra una evaluación de los productos de RT-PCR generados usando ARN de virión (ARNv) como molde y las parejas de cebadores específicas de PIV3 o PIV1 descritas en las Figuras 14A y 14B. Se omitió la etapa de transcripción inversa en un duplicado de cada molde, según se indica, para confirmar que el producto de PCR procedía de ARN. Para rPIV3-1, la pareja de cebadores específica de PIV3 A daba origen al producto de 4,6 kb esperado, mientras que la pareja de cebadores 3, específica para las secuencias de PIV-1, no presente en rPIV3-1, no producía producto. Se muestran en paralelo controles positivos usando ARNv de rPIV3/JS (marcado como rPIV3) o PIV1/Wash64 (marcado como PIV1).

La Figura 16 representa secuencias de uniones PIV3-PIV1 en los productos de RT-PCR de rPIV3-1 mostrados en las Figuras 14A y 14B que se determinaron. Se presenta la secuencia para cada una de las cuatro regiones de unión (Regiones I-IV) y se alinea con las regiones correspondientes de rPIV3/JS (línea superior) y PIV1/Wash64 (línea inferior), que se secuenciaron en paralelo a partir de productos de RT-PCR. Las barras verticales indican la identidad de secuencia y las regiones recuadradas indican mutaciones y sitios de restricción introducidos. El cambio de codón de Gln a Glu en el gen F quimérico está indicado por un recuadro sombreado. Están subrayados los codones de inicio y determinación.

Las Figs. 17A-17B muestran geles de secuenciación para la región III (izquierda) y IV (derecha) de productos de RT-PCR de rPIV3-1 en comparación con rPIV3 (izquierda) o PIV1 (derecha). Los codones de inicio y terminación están marcados por un recuadro, los sitios de restricción están marcados por flechas. La Figura 18 representa el crecimiento multicíclico de PIV parentales y quiméricos en cultivo tisular. Se inocularon monocapas de células LLC-MK2 con virus a una MOI de 0,01 y las células infectadas con virus se incubaron a 32 °C en presencia de tripsina. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo tisular a intervalos de 24 horas, se congelaron y se analizaron en el mismo ensayo de $DICT_{50}$ usando la hemadsorción para identificar los cultivos infectados por virus. Cada punto representa el título medio de tres cultivos separados, indicándose el E.E.. La línea horizontal de puntos indica el límite inferior de detección viral.

La Figura 19 ilustra la introducción de las tres mutaciones de gen L de *cp45* en pFLC.2G+.hc, el clon de ADNc antigenómico del virus quimérico rPIV3-1. El pTM(L)942/992/1558 (A) es un clon de plásmido del gen de L que lleva las tres mutaciones encontradas en *cp45*. La mutación en la posición aminoacídica 942 en la proteína L de PIV3 es una sustitución de tyr (*wt*) a his (*cp45*) y se suprimió un sitio *Eae* I cercano para marcar este sitio. De forma similar, la mutación 992 es un cambio de leu a phe con un sitio *Bsr* I suprimido y la mutación 1558 es un cambio de thr a ile con un sitio *Ava* II suprimido. El fragmento *Sph*I-*Nhe*I de 2,9 kb presente en pTM(L)942/992/1558 se introdujo en pFLC.2G+.hc (B), llevando el plásmido el clon de ADNc de longitud completa de rPIV3-1, para dar el pFLC+.hc.*cp45*L (C). Para las construcciones en (B) y (C), los recuadros en negro indican la localización de la ribozima del virus de la hepatitis D y el terminador de T7, las regiones sombreadas son las ORF F y HN de PIV1 y los recuadros en blanco representan secuencias derivadas de PIV3. Se usó el pFLC.2G+.hc.*cp45*L en la transfección para producir el virus recombinante quimérico atenuado denominado rPIV3-1. *cp45*L.

60 Descripción de las realizaciones específicas

[0027] La presente invención se refiere a composiciones y métodos para producir y modificar PIV infecciosos a partir de moléculas polinucleotídicas aisladas, preferentemente ADNc. Las partículas de PIV infecciosas se producen

mediante un sistema de coexpresión recombinante que permite la introducción de cambios definidos en PIV infecciosos. Estas modificaciones son útiles en una amplia diversidad de aplicaciones, incluyendo el desarrollo de cepas vacunales vivas atenuadas que lleven mutaciones atenuantes definidas predeterminadas.

5 **[0028]** El PIV infeccioso de la invención se produce por coexpresión intracelular o sin células de una o más moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican un ARN de genoma o antígeno de PIV, junto con uno o más polinucleótidos que codifican proteínas virales necesarias para generar una nucleocápside que se replique y se transcriba. Entre las proteínas virales útiles para la coexpresión para producir PIV infecciosos están la proteína principal de la nucleocápside (N), la fosfoproteína de la nucleocápside (P), la proteína grande de la polimerasa (L), la
10 proteína de fusión (F), la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de la matriz (M). También son útiles en este contexto productos de las ORFs (*open reading frames* o pautas abiertas de lectura) C, D y V de PIV.

[0029] Se construyen ADNc que codifican un genoma o antígeno de PIV para su coexpresión intracelular o *in vitro* con las proteínas virales necesarias para formar PIV infecciosos. Por "antígeno de PIV" se entiende una molécula polinucleotídica de sentido positivo aislada que sirve como molde para la síntesis de genoma de PIV de progenie. Preferentemente, se construye un ADNc que es una versión de sentido positivo del genoma de PIV correspondiente al ARN intermediario replicativo, o antígeno, para minimizar las posibilidades de hibridación con transcritos de sentido positivo de secuencias de complementación que codifiquen las proteínas necesarias para
15 generar una nucleocápside que se replique y se transcriba.

[0030] En algunas realizaciones de la invención, el genoma o antígeno de un PIV recombinante (PIVr) sólo tiene que contener aquellos genes o porciones de los mismos necesarios para hacer infecciosas las partículas virales o subvirales codificadas por los mismos. Además, los genes o porciones de los mismos pueden ser
25 proporcionados mediante más de una molécula polinucleotídica, es decir, un gen puede proporcionarse por complementación o similar a partir de una molécula de nucleótido separada. En otras realizaciones, el genoma o antígeno de PIV codifica todas las funciones necesarias para el crecimiento, la replicación y la infección viral sin la participación de un virus auxiliar o una función viral proporcionada por un plásmido o línea celular auxiliar.

[0031] Por "PIV recombinante" se entiende una partícula viral o subviral de PIV o tipo PIV derivada directa o indirectamente de un sistema de expresión recombinante o propagada a partir de partículas virales o subvirales producidas a partir del mismo. El sistema de expresión recombinante empleará un vector de expresión recombinante que comprende una unidad transcripcional unida operativamente que comprende un ensamblaje de al menos un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica de PIV, por ejemplo, un
35 promotor, una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARN de PIV y secuencias de inicio y terminación de la transcripción apropiadas.

[0032] Para producir un PIV infeccioso a partir de un genoma o antígeno de PIV expresado por ADNc, el genoma o antígeno se coexpresa con las proteínas N, P y L de PIV necesarias para (i) producir una nucleocápside capaz de la replicación del ARN y (ii) hacer las nucleocápsides de la progenie competentes tanto para la replicación como para la transcripción del ARN. La transcripción por la nucleocápside del genoma proporciona las otras proteínas de PIV e inicia una infección productiva. Como alternativa, pueden suministrarse por coexpresión proteínas de PIV adicionales necesarias para una infección productiva.
40

[0033] La síntesis de genoma o antígeno de PIV junto con las proteínas virales mencionadas anteriormente también puede conseguirse *in vitro* (sin células), por ejemplo, usando una reacción de transcripción-traducción combinada, seguida de transfección en células. Como alternativa, puede sintetizarse ARN de genoma o antígeno *in vitro* y transfectarse en células que expresan proteínas de PIV.

[0034] En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan secuencias de complementación que codifican las proteínas necesarias para generar una nucleocápside de PIV que se replique y se transcriba mediante uno o más virus auxiliares. Dichos virus auxiliares pueden ser de tipo silvestre o mutante. Preferentemente, el virus auxiliar puede distinguirse fenotípicamente del virus codificado por el ADNc de PIV. Por ejemplo, es deseable proporcionar anticuerpos monoclonales que reaccionen inmunológicamente con el virus auxiliar, pero no con el virus codificado
55 por el ADNc de PIV. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos neutralizantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden usarse en cromatografía de afinidad para separar el virus auxiliar del virus recombinante. Para contribuir a la obtención de dichos anticuerpos, pueden introducirse mutaciones en el ADNc de PIV para proporcionar diversidad antigénica a partir del virus auxiliar, tal como en los genes de glicoproteína HN o F.

[0035] En realizaciones alternativas de la invención, las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas están codificadas por uno o más vectores de expresión no virales, que pueden ser iguales o distintos de los que codifican el genoma o antígeno. Pueden incluirse si se desea proteínas adicionales, cada una codificada por su propio vector o por un vector que codifique una o más de las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de
60

PIV deseadas, o el genoma o antigenoma completo. La expresión del genoma o antigenoma y proteínas de plásmidos transfectados puede conseguirse, por ejemplo, estando cada ADNc bajo el control de un promotor para la ARN polimerasa de T7, que a su vez se suministra por infección, transfección o transducción con un sistema de expresión para la ARN polimerasa de T7, por ejemplo, una cepa MVA de virus vaccinia recombinante que exprese la ARN polimerasa de T7 (Wyatt et al., *Virology*, 210: 202-205 (1995)). Las proteínas virales y/o la ARN polimerasa de T7 también pueden proporcionarse por células de mamífero transformadas o por transfección de proteína o ARNm preformado.

[0036] Puede construirse un antigenoma de PIV para usar en la presente invención, por ejemplo, ensamblando segmentos de ADNc clonados, que representan en conjunto el antigenoma completo, por reacción en cadena de la polimerasa o similar (PCR; descrita en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202 y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, San Diego (1990), de copias obtenidas por transcripción inversa de ARNm o ARN de genoma de PIV. Por ejemplo, se genera una primera construcción que comprende ADNc que contienen el extremo a la izquierda del antigenoma, que abarca desde un promotor apropiado (por ejemplo, promotor de ARN polimerasa de T7) y se ensambla en un vector de expresión apropiado, tal como un plásmido, cósmido, fago o vector de virus ADN. El vector puede modificarse por mutagénesis y/o inserción de un polienlazador sintético que contiene sitios de restricción únicos diseñados para facilitar el ensamblaje. Para facilitar la preparación, las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas pueden ensamblarse en uno o más vectores separados. El extremo a la derecha del plásmido antigenoma puede contener secuencias adicionales si se desea, tales como una ribozima flanqueante y terminadores de la transcripción de T7 en tándem. La ribozima puede ser de tipo cabeza de martillo (por ejemplo, Grosfeld et al., (1995), anteriormente), que produciría un extremo 3' que contiene un solo un nucleótido no viral, o puede ser cualquiera de las otras ribozimas adecuadas tales como la del virus de la hepatitis delta (Perrotta et al., *Nature* 350: 434-436 (1991)), que produciría un extremo 3' libre de nucleótidos que no fueran de PIV. Los extremos a la izquierda y la derecha se unen después mediante un sitio de restricción común.

[0037] Pueden realizarse una diversidad de inserciones, delecciones y reorganizaciones de nucleótidos en el genoma o antigenoma de PIV durante o después de la construcción del ADNc. Por ejemplo, pueden sintetizarse secuencias de nucleótidos deseadas específicas e insertarse en regiones apropiadas en el ADNc usando sitios de enzimas de restricción convenientes. Como alternativa, pueden usarse técnicas tales como mutagénesis específica, barrido con alanina, mutagénesis por PCR u otros procedimientos de este tipo bien conocidos en la técnica para introducir mutaciones en el ADNc.

[0038] Los medios alternativos para construir un ADNc que codifique el genoma o antigenoma incluyen transcripción inversa-PCR usando condiciones de PCR mejoradas (por ejemplo, como describe en Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5695-5699 (1994)), para reducir el número de componentes de ADNc de subunidades hasta tan pocos como uno o dos trozos. En otras realizaciones pueden usarse promotores diferentes (por ejemplo, T3, SP6) o ribozimas diferentes (por ejemplo, la del virus de la hepatitis delta). Pueden usarse diferentes vectores de ADN (por ejemplo, cósmidos) para la propagación, para alojar mejor el genoma o antigenoma de mayor tamaño.

[0039] Pueden insertarse polinucleótidos aislados (por ejemplo, ADNc) que codifican el genoma o antigenoma en células hospedadoras apropiadas mediante transfección, electroporación, inserción mecánica, transducción o similares, en células que sean capaces de soportar una infección por PIV productiva, por ejemplo, células HEp-2, FRhL-DBS2, LLC-MK2, MRC-5 y Vero. La transfección de secuencias polinucleotídicas aisladas puede introducirse en células cultivadas, por ejemplo, mediante transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., *Cell* 14: 725 (1978); Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603 (1981); Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456 (1973)), electroporación (Neumann et al., *EMBOJ.* 1: 841-845 (1982)), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel et al., (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY (1987), transfección mediada por lípidos catiónicos (Hawley-Nelson et al., *Focus* 15: 73-79 (1993)) o un reactivo de transfección disponible en el mercado, por ejemplo, LipofectACE® (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o similar. Como se ha señalado anteriormente, en algunas realizaciones de la invención, las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas están codificadas por uno o más virus auxiliares que son fenotípicamente distinguibles de los que codifican el genoma o antigenoma. Las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas también pueden estar codificadas por uno o más vectores de expresión que pueden ser iguales o distintos de los que codifican el genoma o antigenoma, y diversas combinaciones de los mismos. Pueden incluirse proteínas adicionales si se desea, codificadas por su propio vector o por un vector que codifique una o más de las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas, o el genoma o antigenoma completo.

[0040] Las composiciones y métodos de la invención permiten un análisis y manipulación de los mecanismos patogénicos y de la biología molecular del PIV usando, por ejemplo, mutaciones definidas para alterar la función o expresión de proteínas de PIV seleccionadas. Usando estos métodos y composiciones se pueden distinguir fácilmente las mutaciones responsables de cambios fenotípicos deseados de mutaciones accidentales silenciosas y seleccionar mutaciones específicas de fenotipo para su incorporación en un genoma o antigenoma de PIV

recombinante para la producción de vacunas.

[0041] Las modificaciones de PIV proporcionadas dentro de la invención están dirigidas a la producción de virus vacunales mejorados, por ejemplo, para potenciar la atenuación viral y la inmunogenicidad vacunal, para suprimir epítomos asociados con una inmunopatología indeseable, para dar cabida a la deriva antigénica, etc. Para conseguir estos y otros objetivos, las composiciones y métodos de la invención permiten que se introduzcan una amplia diversidad de modificaciones en un genoma o antigenoma de PIV para su incorporación en un PIV recombinante infeccioso. Por ejemplo, pueden añadirse genes o segmentos génicos extraños que codifiquen antígenos o epítomos protectores dentro de un clon de PIV para generar cepas de PIV capaces de inducir inmunidad tanto contra PIV como contra el virus o agente del que procedía el antígeno protector. Como alternativa, pueden insertarse genes extraños en su totalidad o en parte, que codifiquen moduladores del sistema inmune, tales como citocinas, para potenciar la inmunogenicidad de un virus vacunal.

[0042] Otras mutaciones que pueden incluirse dentro de clones de PIV de la invención incluyen, por ejemplo, la sustitución de genes heterólogos o segmentos génicos (por ejemplo, un segmento génico que codifique una cola citoplasmática de un gen de glicoproteína) con un gen o segmento génico homólogo en un clon de PIV. Como alternativa, el orden relativo de los genes dentro de un clon de PIV puede cambiarse, el promotor del genoma de PIV puede sustituirse con su homólogo de antigenoma, o un gen o genes seleccionados pueden volverse no funcionales (por ejemplo, por supresión funcional que implica la introducción de un codón de terminación para evitar la expresión del gen). Pueden realizarse otras modificaciones en un clon de PIV para facilitar manipulaciones, tales como la inserción de sitios de restricción únicos en diversas regiones codificantes o no codificantes o en otra parte. Además, pueden eliminarse secuencias génicas no traducidas para aumentar la capacidad para insertar secuencias extrañas.

[0043] Por lo tanto, al proporcionar clones infecciosos de PIV la invención permite que se produzcan de forma recombinante una amplia variedad de alteraciones dentro del genoma (o antigenoma) de PIV, produciendo mutaciones definidas que especifican cambios fenotípicos deseados. Por "clon infeccioso" se entiende un ADNc o su producto, sintético o de otro tipo, ARN capaz de incorporarse directamente en viriones infecciosos que pueden transcribirse en ARN genómico o antigenómico capaz de servir como molde para producir el genoma de partículas virales o subvirales infecciosas. Como se ha señalado anteriormente, pueden introducirse mutaciones definidas por una diversidad de técnicas convencionales (por ejemplo, mutagénesis dirigida) en una copia de ADNc del genoma o antigenoma. El uso de subfragmentos de ADNc genómico o antigenómico para ensamblar un ADNc de genoma o antigenoma completo, como se describe en la presente memoria, tiene la ventaja de que cada región puede manipularse por separado, en el que casos de ADNc pequeño proporcionan una mayor facilidad de manipulación que casos de ADNc grandes, y después ensamblarse fácilmente en un ADNc completo. Por lo tanto, el ADNc de genoma o antigenoma completo, o un subfragmento seleccionado del mismo, puede usarse como un modelo para mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Esto puede ser a través del intermedio de una forma fagémida monocatenaria, tal como usando el kit MUTA-gen[®] o de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) o un método que use el plásmido bicatenario directamente como molde, tal como el kit de mutagénesis Chameleon[®] de Strategene (La Jolla, CA), o mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando un cebador oligonucleotídico o molde que contiene la mutación o mutaciones de interés. Después, un subfragmento mutado puede ensamblarse en el ADNc de genoma o antigenoma completo. Se conocen una diversidad de otras técnicas de mutagénesis y pueden adaptarse de forma rutinaria para usarse en la producción de las mutaciones de interés en un ADNc de genoma o antigenoma de PIV de la invención.

[0044] Por lo tanto, en una realización ilustrativa se introducen mutaciones usando el kit de mutagénesis *in vitro* de fagémidos MUTA-gene[®] disponible en Bio-Rad Laboratories. En resumen, se clona un ADNc que codifica un genoma o antigenoma de PIV en el plásmido pTZ18U y se usa para transformar células CJ236 (Life Technologies). Se preparan preparaciones de fagémido según se recomienda por el fabricante. Se diseñan oligonucleótidos para mutagénesis por introducción de un nucleótido alterado en la posición deseada del genoma o antigenoma. El plásmido que contiene el genoma o antigenoma genéticamente alterado se amplifica después.

[0045] Las mutaciones pueden variar de cambios de un solo nucleótido a la introducción, delección o sustitución de segmentos de ADNc grandes que contienen uno o más genes o segmentos genómicos. Los segmentos genómicos pueden corresponder a dominios estructurales y/o funcionales, por ejemplo, citoplasmáticos, transmembrana o ectodominios de proteínas, sitios activos tales como sitios que median la unión u otras interacciones bioquímicas con diferentes proteínas, sitios epitópicos, por ejemplo, sitios que estimulen la unión de anticuerpos y/o respuestas inmunes mediadas por células o humores, etc. Los segmentos genómicos útiles a este respecto varían de aproximadamente 15-35 nucleótidos en el caso de segmentos genómicos que codifican pequeños dominios funcionales de proteínas, por ejemplo, sitios epitópicos, a aproximadamente 50, 75, 100, 200-500 y 500-1.500 o más nucleótidos.

[0046] La capacidad para introducir mutaciones definidas en PIV infecciosos tienen muchas aplicaciones, incluyendo la manipulación de mecanismos inmunogénicos y patogénicos de PIV. Por ejemplo, las funciones de

proteínas de PIV, incluyendo las proteínas N, P, M, F, HN y L y los productos de las ORF C, D y V pueden manipularse introduciendo mutaciones que supriman o reduzcan el nivel de expresión de proteína, o que produzcan una proteína mutante. En una modificación ejemplar de este tipo, puede modificarse una secuencia en el sitio de escisión de la proteína F y los efectos de esta modificación sobre el crecimiento en cultivos tisulares y sobre la
5 infección y patogénesis del PIV resultante pueden determinarse de forma rutinaria en animales de experimentación.

[0047] También pueden manipularse de forma rutinaria diversas características estructurales del ARN genómico, tales como promotores, regiones intergénicas y señales de transcripción, dentro de los métodos y composiciones de la invención. Los efectos de proteínas de transactivación y secuencias de ARN de acción en cis pueden
10 determinarse fácilmente, por ejemplo, usando un ADNc de antigenoma completo en ensayos en paralelo que emplean minigenomas de PIV (Dimock, et al., J. Virol. 67: 2772-8 (1993), cuyo estado dependiente de rescate es útil en la caracterización de aquellos mutantes que puedan ser demasiado inhibidores para recuperarse en virus infecciosos independientes de replicación.

[0048] La presente invención proporciona además herramientas y métodos para distinguir fácilmente entre mutaciones accidentales silenciosas y mutaciones responsables de diferencias de fenotipo, por ejemplo, introduciendo mutaciones sospechosas, por separado y en diversas combinaciones, en el genoma o antigenoma de un PIV de tipo silvestre infeccioso (es decir, para uno o más caracteres fenotípicos tales como termosensibilidad, replicación en un hospedador seleccionado, etc.). Este procedimiento permite la identificación de mutaciones
20 responsables de fenotipos de vacunas deseados tales como atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador, etc. Las mutaciones identificadas por estos métodos pueden introducirse después en diversas combinaciones para modificar un virus vacunal hasta un nivel de atenuación apropiado, etc., según se desee. Además, la presente invención proporciona la capacidad de combinar mutaciones de diferentes cepas de virus en una sola cepa vacunal.

[0049] Como se ha señalado anteriormente, pueden seleccionarse mutaciones incorporadas dentro de clones de PIV alterados recombinantemente basándose en su capacidad para alterar la expresión y/o función de una proteína de PIV seleccionada, produciendo un cambio fenotípico deseado, o para una diversidad de otros fines. Los cambios fenotípicos deseados incluyen, por ejemplo, cambios en el crecimiento viral en cultivo, termosensibilidad, tamaño de
30 placas, atenuación e inmunogenicidad.

[0050] Por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica el genoma o antigenoma puede modificarse mediante una inserción, reorganización, delección o sustitución de nucleótidos para especificar atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador, alteración
35 en la expresión génica o un cambio en un epítipo inmunogénico.

[0051] En un aspecto de la invención, se identifican mutaciones que aparecen en PIV atenuados derivados biológicamente y se introducen individualmente o en combinación en un clon de PIV de longitud completa, y se determinan los fenotipos de virus recombinantes rescatados que contienen las mutaciones introducidas. En
40 realizaciones ejemplares, se incorporan dentro de clones de PIV recombinantes cambios de aminoácidos presentados por virus mutantes derivados biológicamente sobre un PIV de tipo silvestre, por ejemplo, cambios presentados por mutantes de PIV que tienen fenotipos *ts*, *ca* o *att*. Estos cambios de PIV mutantes derivados biológicamente especifican características deseadas en los clones resultantes, por ejemplo, un fenotipo de atenuación especificado por una mutación adoptada del mutante de HPIV3 JS *cp45*. Estos cambios se introducen
45 preferentemente en virus recombinantes usando dos o tres cambios de nucleótidos en comparación con una secuencia mutante derivada biológicamente o de tipo silvestre correspondiente, que tiene el efecto de estabilizar la mutación contra la reversión genética.

[0052] La presente invención también proporciona un PIV recombinante que tiene múltiples mutaciones
50 determinantes de fenotipo introducidas en combinaciones seleccionadas en el genoma o antigenoma de un clon infeccioso. Este procedimiento, acoplado con la evaluación de fenotipo, proporciona un PIV recombinante mutante que tiene características deseadas tales como atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador, etc. Por lo tanto, se describen clones de PIV ejemplares en la presente memoria que incorporan una o más, y preferentemente al menos dos mutaciones atenuantes, por ejemplo,
55 mutaciones *ts*, *ca* o *att* adoptadas de un mutante de PIV derivado biológicamente, tal como JS *cp45*. Los genes diana para adoptar mutaciones derivadas biológicamente en un PIV recombinante en este contexto incluyen la proteína de la nucleocápside N, la fosfoproteína P, la subunidad grande de la polimerasa L, la proteína de la matriz M, la proteína hemaglutinina-neuraminidasa HN, la proteína de fusión F y los productos de las ORF C, D y V. También se fijan como objetivo secuencias extragénicas, por ejemplo, secuencias en las regiones tráiler y líder 3' de
60 un genoma de PIV, y en elementos de acción en cis tales como secuencias del inicio del gen y del final del gen, por ejemplo, la señal de inicio del gen de N. Las mutaciones ejemplares incorporadas en un PIV recombinante en la presente memoria incluyen una o más sustituciones de nucleótidos que determinan un cambio o cambios de aminoácidos en el gen de polimerasa L, por ejemplo, en Tyr₉₄₂, Leu₉₉₂ y/o Thr₁₅₅₈. Por ejemplo, se describen

recombinantes de PIV en los que Tyr₉₄₂ se sustituye por His, Leu₉₉₂ se sustituye por Phe y/o Thr₁₅₅₈ se sustituye por Ile. Estas mutaciones se han incorporado con éxito en diversos recombinantes de PIV ejemplares en la presente memoria, incluyendo los recombinantes r942, r992, r1558, r942/992, r992/1558, r942/1558 o r942/992/1558 descritos en los Ejemplos a continuación. Otras mutaciones ejemplares adoptadas de un mutante de PIV derivado biológicamente incluyen una o más mutaciones en la proteína N, incluyendo mutaciones específicas en una posición correspondiente a los restos Val₉₆ o Ser₃₈₉ de JS *cp45*. En aspectos más detallados, estas mutaciones se representan como Val₉₆ a Ala o Ser₃₈₉ a Ala. También se describen en los Ejemplos a continuación un PIV recombinante que codifica una sustitución de aminoácido en la proteína C, por ejemplo, una mutación en una posición que corresponde a Ile₉₆ de JS *cp45*, representada preferentemente por una sustitución de Ile₉₆ a Thr. Las mutaciones ejemplares adicionales adoptadas de mutantes de PIV derivados biológicamente incluyen una o más mutaciones en la proteína F, incluyendo mutaciones adoptadas de JS *cp45* en una posición que corresponde a los restos Ile₄₂₀ o Ala₄₅₀ de JS *cp45*, representadas preferentemente por las sustituciones de aminoácidos Ile₄₂₀ a Val o Ala₄₅₀ a Thr. Otros recombinantes de PIV dentro de la invención adoptan una o más sustituciones de aminoácidos en la proteína HN, como se ejemplifica a continuación en la presente memoria mediante un PIV recombinante que adopta una mutación en una posición correspondiente al resto Val₃₈₄ de JS *cp45*, representada preferentemente por la sustitución de Val₃₈₄ a Ala. Otros ejemplos adicionales dentro de este aspecto de la invención incluyen un PIV recombinante que incorpora una o más mutaciones en una secuencia extragénica, por ejemplo, una secuencia líder 3' de genoma o antígeno de PIV recombinante. Las mutaciones ejemplares en este contexto incluyen mutaciones en el líder 3' que aparecen en una o más posiciones que corresponden al nucleótido 23, 24 y/o 28 de JS *cp45*, por ejemplo, un cambio de T a C en el nucleótido 23, un cambio de C a T en el nucleótido 24 o un cambio de G a T en el nucleótido 28. Otras mutaciones extragénicas adicionales incluyen una o más mutaciones en una secuencia de inicio del gen de N, como se ejemplifica a continuación en la presente memoria mediante una mutación en la secuencia de inicio del gen de N en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS *cp45*, representada preferentemente por un cambio de A a T. Las mutaciones ejemplares anteriores adoptadas de un PIV mutante derivado biológicamente se evaluaron y se combinaron en un PIV recombinante en los Ejemplos a continuación para dar como resultado, de forma individual y/o en combinación, nuevas cepas de vacunas candidatas atenuadas, como se ejemplifica mediante los recombinantes denominados en la presente memoria *rcp45*, *rcp45* 3'NCMFHN, *rcp45* 3'NL, *rcp45* 3'N y *rcp45* F. Otros recombinantes de PIV dentro de la invención incorporarán una pluralidad y hasta una dotación completa de las mutaciones presentes en uno o más de estos recombinantes ejemplares, así como mutaciones identificadas en otras cepas de PIV mutantes derivadas biológicamente identificadas y adoptadas en un PIV recombinante de acuerdo con los contenidos de la presente memoria.

[0053] Las mutaciones identificadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se recopilan en un "menú" y se introducen en diversas combinaciones para calibrar un virus vacunal a un nivel seleccionado de atenuación, inmunogenicidad y estabilidad. En realizaciones preferidas, la invención proporciona la complementación de una o más mutaciones adoptadas de PIV derivados biológicamente, por ejemplo, mutaciones *ts*, *ca* y *att*, con tipos adicionales de mutaciones que implican al mismo gen o a genes diferentes. Los genes diana para mutación en este contexto también incluyen la proteína de la nucleocápside N, la fosfoproteína P, la subunidad grande de la polimerasa L, la proteína de la matriz M, la proteína hemaglutinina-neuraminidasa HN, la proteína de fusión F y los productos de las ORF C, D y V. En un aspecto, se proporcionan PIV recombinantes en los que se produce al menos una mutación atenuante en el gen de la polimerasa de PIV L e implica una sustitución de nucleótido que especifica un fenotipo *ts* o *att* adoptado de una cepa de PIV mutante derivada biológicamente, por ejemplo, JS *cp45*. Los recombinantes de HPIV3 ejemplares descritos en la presente memoria incluyen los recombinantes r942, r992, r1558, r942/992, r992/1558, r942/1558 o r942/992/1558 descritos en los Ejemplos a continuación. Estos clones de PIV ejemplares incorporan una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado un cambio de aminoácido en el gen de la polimerasa, por ejemplo, en Tyr₉₄₂, Leu₉₉₂ y/o Thr₁₅₅₈. Por ejemplo, se describen recombinantes de PIV en los que Tyr₉₄₂ se sustituye por His, Leu₉₉₂ se sustituye por Phe y/o Thr₁₅₅₈ se sustituye por Ile. Preferentemente, se incorporan dos o tres mutaciones en un codón que especifica una mutación atenuante que añade una estabilidad aumentada contra la reversión fenotípica.

[0054] En aspectos adicionales, pueden producirse una diversidad de otras alteraciones genéticas en un genoma o antígeno de PIV recombinante para su incorporación en un PIV recombinante infeccioso, en solitario o junto con una o más mutaciones atenuantes adoptadas de un PIV mutante derivado biológicamente. Pueden insertarse o sustituirse genes heterólogos (por ejemplo, de cepas de PIV diferentes o fuentes distintas de PIV, tales como otros virus, por ejemplo, RSV o virus del sarampión), en su totalidad o en parte, cambiarse el orden de los genes, eliminarse solapamientos de genes, sustituirse el promotor del genoma de PIV con su homólogo antígeno e incluso deletarse genes no esenciales completos. En un aspecto, un gen de PIV seleccionado, por ejemplo la ORF C, D o V, se deleta funcionalmente para producir un PIV recombinante que tenga características fenotípicas novedosas, por ejemplo, un crecimiento aumentado *in vitro* y/o una atenuación *in vivo*. También puede modificarse por ingeniería genética un clon de PIV infeccioso de la invención para aumentar su inmunogenicidad e inducir un nivel de protección superior al proporcionado por la infección natural, o para suprimir epítopos asociados con reacciones inmunopatológicas indeseables. La inmunogenicidad aumentada de las vacunas producidas por la presente invención aborda uno de los mayores obstáculos para controlar el PIV, en concreto la naturaleza

- incompleta de la inmunidad inducida por la infección natural. En este contexto, puede insertarse un gen o genes o segmento o segmentos génicos adicionales en o próximo al genoma o antigenoma de PIV que pueda ponerse bajo el control de un conjunto común o independiente de señales de transcripción. Los genes de interés incluyen los que codifican citocinas (por ejemplo, de IL-2 a IL-15, especialmente IL-2, IL-6 e IL-12, etc.) y proteínas ricas en epítomos de células T auxiliares. La proteína adicional puede expresarse como una proteína separada o como una quimera obtenida por ingeniería genética a partir de una segunda copia de una de las proteínas de PIV, tal como HN. Esto proporciona la capacidad de modificar y mejorar la respuesta inmune contra PIV tanto cuantitativa como cualitativamente.
- 10 **[0055]** Otras mutaciones útiles dentro de la invención implican la sustitución del extremo 3' del genoma con su homólogo de antigenoma, que se asocia con cambios en la replicación y la transcripción del ARN. Además, las regiones intergénicas pueden acortarse o aumentarse de longitud, o cambiarse su contenido de secuencia. En otros aspectos adicionales, un PIV útil en una formulación de vacuna puede modificarse convenientemente para dar cabida a la deriva antigénica en el virus circulante. Típicamente, la modificación será en las proteínas HN y/o F. Por ejemplo, una forma antigénica seleccionada de un gen de F o HN completo, o el segmento o segmentos que codifican regiones inmunogénicas particulares de los mismos, se incorpora en un ADNc de genoma o antigenoma de PIV por sustitución de una región homóloga en el clon infeccioso, o por adición de una o más copias del gen de modo que estén representadas varias formas antigénicas en el clon resultante. El virus de progenie producido a partir del ADNc de PIV modificado se usa después en protocolos de vacunación contra cepas emergentes.
- 15 **[0056]** Otras mutaciones para usar en un PIV infeccioso de la invención incluyen mutaciones en señales de acción en cis identificadas durante el análisis mutacional de minigenomas de PIV. Por ejemplo, el análisis de inserciones y deleciones de secuencias líder y tráiler y flanqueantes identifica promotores virales y señales de transcripción y proporciona una serie de mutaciones asociadas con grados variables de reducción de la replicación o transcripción del ARN. La mutagénesis por saturación (por la que cada posición se modifica a su vez en cada una de las alternativas de nucleótido) de esta señales de acción en cis también identifica mutaciones que reducen o aumentan la replicación o transcripción del ARN. Cualquiera de estas mutaciones puede insertarse en el genoma o antigenoma completo, como se describe en la presente memoria.
- 20 **[0057]** Pueden realizarse modificaciones adicionales en clones de PIV para facilitar las manipulaciones, tales como la inserción de sitios de restricción únicos en diversas regiones intergénicas o en otra parte. También pueden eliminarse secuencias génicas no traducidas para aumentar la capacidad de insertar secuencias extrañas.
- [0058]** Se realizan determinadas sustituciones, inserciones, deleciones o reorganizaciones de genes o segmentos génicos dentro del PIV recombinante de la invención (por ejemplo, sustituciones de un segmento génico que codifica una proteína o región proteica seleccionada, por ejemplo, una cola citoplasmática, un dominio transmembrana o ectodominio, un sitio o región epitópica, un sitio o región de unión, un sitio o región activa que contiene en un sitio activo, etc.) en relación estructural o funcional con un gen o segmento génico "homólogo" existente del mismo PIV o de un PIV diferente u otra fuente. Dichas modificaciones producen nuevos recombinantes que tienen los cambios fenotípicos deseados en comparación con PIV parentales o de tipo silvestre u otras cepas virales. Por ejemplo, los recombinantes de este tipo pueden expresar una proteína quimérica que tenga una cola citoplasmática y/o un dominio transmembrana de un PIV fusionado a un ectodominio de otro PIV. Otros recombinantes ejemplares de este tipo expresan regiones proteicas duplicadas, tales como regiones inmunogénicas duplicadas.
- 35 **[0059]** Como se usan en la presente memoria, los genes, segmentos génicos, proteínas o regiones proteicas "homólogos", son típicamente de fuentes heterólogas (por ejemplo, de genes de PIV diferentes, o que representan el mismo gen o segmento génico (es decir, homólogo o alélico) en tipos o cepas de PIV diferentes). Los homólogos típicos seleccionados en este contexto comparten características estructurales básicas, por ejemplo, cada homólogo puede codificar una proteína o dominio estructural proteico comparable, tal como un dominio citoplasmático, dominio transmembrana, ectodominio, sitio o región de unión, sitio o región epitópica, etc. Los dominios homólogos y sus segmentos génicos codificantes abarcan una colección de especies que tienen una variedad de tamaño y variaciones de secuencia definidas por una actividad biológica común entre las variantes de segmento génico o dominio. Por ejemplo, dos dominios proteicos seleccionados codificados por segmentos génicos homólogos dentro de la invención comparten sustancialmente la misma actividad cualitativa, tal como proporcionar una función transmembrana, una actividad de unión específica, un sitio de reconocimiento inmunológico, etc. Más típicamente, una actividad biológica específica compartida entre homólogos, por ejemplo, entre segmentos proteicos o proteínas seleccionadas, será sustancialmente cuantitativamente similar, es decir, no variará respecto a los niveles de actividad cuantitativa más del 30%, preferentemente no más del 20%, más preferentemente no más del 5-10%.
- 45 **[0060]** Los genes y segmentos génicos homólogos, así como otros polinucleótidos descritos en la presente memoria para producir un PIV recombinante dentro de la invención, comparten preferentemente una identidad de secuencia sustancial con una "secuencia de referencia" polinucleotídica seleccionada, por ejemplo, con otra secuencia homóloga seleccionada. Como se usa en la presente memoria, una "secuencia de referencia" es una

secuencia definida usada como base para la comparación de secuencia, por ejemplo, un segmento de un ADNc o gen de longitud completa, o un ADNc o secuencia génica completa. En general, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos, frecuentemente una longitud de al menos 25 nucleótidos, y con frecuencia una longitud de al menos 50 nucleótidos. Puesto que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una

5 secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos y (2) comprender además una secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos, se realizan típicamente comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos por comparación de las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere

10 a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguas, en la que una secuencia polinucleotídica puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos, y en la que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de los dos secuencias. Pueden realizarse

15 alineamientos de secuencias óptimos para alinear una ventana de comparación mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer

20 Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de similitud de secuencia a lo largo de la ventana de comparación) generado por los diversos métodos. La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias polinucleotídicas son idénticas (es decir, en base a nucleótido por nucleótido) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de

25 la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial", como se usa en la presente memoria, indica una característica de una secuencia

30 polinucleotídica en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 por ciento, preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 90 al 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula

35 comparando la secuencia de referencia con la secuencia polinucleotídica que puede incluir deleciones o adiciones que asciendan al 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño.

[0061] Además de estas relaciones de secuencias polinucleotídicas, las proteínas y regiones proteicas codificadas

40 por un PIV recombinante de la invención también se seleccionan típicamente para que tengan relaciones conservativas, es decir, que tengan una identidad de secuencia o similitud de secuencia sustancial con polipéptidos de referencia seleccionados. Como se aplica a los polipéptidos, la expresión "identidad de secuencia" se refiere a péptidos que comparten aminoácidos idénticos en posiciones correspondientes. La expresión "similitud de secuencia" se refiere a péptidos que tienen aminoácidos idénticos o similares (es decir, sustituciones conservativas)

45 en posiciones correspondientes. La expresión "identidad de secuencia sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando los pesos por huecos por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 90 por ciento, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 95 por ciento o más (por ejemplo, una identidad de secuencia del 99 por ciento). La expresión "similitud

50 sustancial" significa que dos secuencias peptídicas comparten porcentajes correspondientes de similitud de secuencia. Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la posibilidad de intercambio de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas son glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas

55 hidroxiladas son serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida son asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas son fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas son lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina,

60 alanina-valina y asparagina-glutamina. Las abreviaturas para los veinte aminoácidos de origen natural usados en la presente memoria siguen el uso convencional (Immunology - A Synthesis (2ª ed., E.S. Golub & D.R. Gren, eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1991). También pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales,

aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil lisina, e-N-acetil lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilina, ω -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). Además, los aminoácidos pueden modificarse por glicosilación, fosforilación y similares.

[0062] El PIV infeccioso producido a partir de un genoma o antigenoma expresado por ADNc puede ser cualquiera de las cepas de PIV o tipo PIV, por ejemplo, humano, bovino, murino, etc. Para suscitar una respuesta inmune protectora, la cepa PIV puede ser una que sea endógena al sujeto que se está inmunizando, tal como un PIV humano que se usa para inmunizar a seres humanos. El genoma o antigenoma puede modificarse, sin embargo, para expresar genes o segmentos génicos de PIV heterólogos o genes o segmentos génicos de otras fuentes heterólogas, por ejemplo, RSV o virus del sarampión. Por lo tanto, los PIV infecciosos destinados a su administración a seres humanos pueden ser PIV humanos que se han modificado para contener genes o segmentos génicos de un tipo de PIV bovino o murino tal como con el fin de la atenuación. El BPIV3 posee mutaciones de intervalo de hospedador que restringen su replicación en monos rhesus y seres humanos (Karron et al., anteriormente, 1995a; van Wyke Coelingh et al., 1988)). El gen o genes, mutaciones y secuencias reguladoras de acción en cis de BPVI3 que especifiquen los fenotipos deseados, por ejemplo, la restricción del intervalo de hospedador, se identificarán por su sustitución de las secuencias correspondientes en un rPIV de la invención, y su incorporación dentro de un rPIV modificado adicionalmente para desarrollar otros agentes vacunales útiles adicionales. De forma similar, las mutaciones de JS *cp45* que se sabe que confieren mutaciones atenuantes del intervalo de hospedador distintas de ts para el mono rhesus (Hall et al., anteriormente, (1992)) se identificarán asimismo y se incorporarán en agentes vacunales de rPIV modificados de la invención. Como alternativa, un PIV bovino puede modificarse para contener genes que codifiquen, por ejemplo, proteínas o epítopos inmunogénicos que generen protección contra una infección por PIV humano. Por ejemplo, los genes de glicoproteína de PIV humano pueden sustituir a los genes de glicoproteína bovinos homólogos, de modo que el PIV bovino genere una respuesta inmune protectora en seres humanos contra cepas de PIV humano.

[0063] Pueden sustituirse genes individuales, segmentos génicos o un solo o múltiples nucleótidos de un PIV por una secuencia o secuencias homólogas de un PIV heterólogo u otra fuente. Por ejemplo, segmentos génicos heterólogos, tales como uno que codifica una cola citoplasmática, un dominio transmembrana o ectodominio, un sitio o región epitópica, un sitio o región de unión, un sitio o región activa que contiene un sitio activo, etc. de una proteína seleccionada de un PIV sustituyen a un segmento génico homólogo en otro PIV para dar nuevos recombinantes, por ejemplo, recombinantes que expresen una proteína quimérica que tenga una cola citoplasmática y/o dominio transmembrana de un PIV fusionado a un ectodominio de otro dominio PIV. Los segmentos génicos preferidos a este respecto varían de aproximadamente 15-35 nucleótidos en el caso de segmentos génicos que codifican pequeños dominios funcionales de proteínas, por ejemplo, sitios epitópicos, a aproximadamente 50, 75, 100, 200-500 ó 500-1.500 o más nucleótidos para segmentos génicos que codifican dominios o regiones proteicas de mayor tamaño.

[0064] Los dominios seleccionados de proteínas HN y/o F de una cepa de PIV pueden sustituirse en un clon de PIV heterólogo para producir un virus recombinante capaz de estimular una respuesta inmune de protección cruzada frente a ambas cepas de PIV en un hospedador inmunizado. Los clones de PIV modificados pueden comprender una quimera de una secuencia genómica o antigenómica de PIV humano y al menos una secuencia de PIV no humano, por ejemplo un polinucleótido que contiene secuencias tanto de PIV humano como bovino. La sustitución de una secuencia codificante o secuencia no codificante de PIV humano (por ejemplo, un promotor, el final de un gen, el inicio de un gen, un elemento intergénico u otro elemento de acción en cis) con una secuencia de PIV bovino o murino homóloga produce recombinantes que tienen una diversidad de efectos atenuantes posibles. Por ejemplo, un efecto de intervalo de hospedador surgirá con frecuencia de un gen de PIV heterólogo que no funcione eficazmente en una célula humana, de la incompatibilidad de la secuencia o proteína heteróloga con una secuencia o proteína de PIV humano biológicamente interactiva (por ejemplo, una secuencia o proteína que comúnmente coopere con la secuencia o proteína sustituida para la transcripción, traducción, ensamblaje, etc. viral) entre otros efectos atenuantes útiles. Otro aspecto más de la invención, la inserción de genes o segmentos génicos extraños y, en algunos casos, de secuencias de nucleótidos no codificantes, en el genoma de PIV da como resultado un aumento deseado en la longitud del genoma que causa otros efectos fenotípicos deseados adicionales. Se espera que la longitud aumentada del genoma dé como resultado la atenuación del clon de PIV resultante, dependiente en parte de la longitud del inserto. Además, la expresión de ciertas proteínas de un gen insertado en un PIV recombinante dará como resultado la atenuación del virus debido a la acción de la proteína. Esto se ha descrito para IL-2 expresado en virus vaccinia (véase, por ejemplo, Flexner et al., Nature 33: -259-62 (1987)) y también se esperaría para el interferón gamma.

[0065] Las delecciones, inserciones, sustituciones y otras mutaciones que implican cambios de genes virales completos o segmentos génicos en un PIV recombinante de la invención producen candidatos a vacunas altamente estables, que son particularmente importantes en el caso de individuos inmunodeprimidos. Muchas de estas

mutaciones darán como resultado la atenuación de las cepas vacunales resultantes, mientras que otras especificarán diferentes tipos de cambios fenotípicos deseados. Por ejemplo, se conocen determinados genes virales que codifican proteínas que interfieren específicamente con la inmunidad del hospedador (véase, por ejemplo, Kato et al., EMBO. J. 16: 578-87 (1997)). Se espera que la supresión de dichos genes en virus vacunales reduzca la virulencia y la patogénesis y/o mejore la inmunogenicidad.

[0066] En aspectos preferidos de la invención, los clones de PIV modificados representan una quimera de dos o más genomas de PIV humano, por ejemplo un clon que contiene secuencias polinucleotídicas de HPIV3 unidas a secuencias de uno o más PIV humanos heterólogos, tales como HPIV1 y HPIV2. Por lo tanto, los genes o segmentos génicos individuales de PIV3 humano pueden sustituirse o complementarse con genes o segmentos génicos homólogos de HPIV2 o HPIV2, o viceversa. En un ejemplo descrito a continuación en la presente memoria, la invención proporciona un clon de PIV, rPIV3-1, en el que ambos genes de glicoproteína F y HN de HPIV1 sustituyen a sus genes homólogos en un fondo HPIV3, produciendo un virus quimérico que tiene características inmunológicas representativas de ambas cepas parentales.

[0067] En aspectos adicionales de la invención, los clones de PIV o PIV quimérico que tienen otras alteraciones de genes o segmentos génicos, como se han descrito anteriormente, se modifican adicionalmente introduciendo una o más mutaciones atenuantes adoptadas de un PIV mutante derivado biológicamente, por ejemplo, HPIV3 JS cp45, para conseguir un derivado mutante quimérico atenuado, o atenuado adicionalmente. Por ejemplo, uno o más polinucleótidos codificantes o no codificantes de PIV humano pueden sustituirse con una secuencia homóloga de un PIV humano, PIV bovino o PIV murino heterólogo, como se ha descrito anteriormente, y su alteración puede combinarse con una o más mutaciones que especifican, por ejemplo, un fenotipo ts, ca o att adoptado de un mutante de PIV atenuado derivado biológicamente, para dar un virus vacunal atenuado o atenuado adicionalmente (es decir, en comparación con el clon quimérico o el virus parental derivado biológicamente). Como alternativa, la delección funcional de un gen o segmento génico no esencial, tal como la ORF C, D o V, puede combinarse en un PIV recombinante con una o más mutaciones que especifican un fenotipo ts, ca o att a partir de mutantes de PIV derivados biológicamente para producir una cepa vacunal atenuada. Estas modificaciones combinatorias producen un PIV recombinante que tiene las características fenotípicas deseadas, por ejemplo, una producción aumentada de virus, una atenuación aumentada y/o una resistencia genética a reversión desde un fenotipo atenuado, debido a los efectos combinados de las diferentes mutaciones seleccionadas.

[0068] En un diseño de mutación combinatoria, se proporciona un PIV modificado que comprende una quimera de una secuencia genómica o antigenómica de PIV humano y al menos una secuencia de PIV no humano, por ejemplo, un polinucleótido que contiene secuencias de PIV tanto humano como bovino, y que también incorpora una o más mutaciones adoptadas de un PIV derivado biológicamente, por ejemplo, una o más mutaciones ts, ca o att de origen natural. Como alternativa, el PIV modificado puede ser una quimera de dos o más genomas de PIV humanos, por ejemplo, un polinucleótido que contiene secuencias de HPIV3 unidas a secuencias de uno o más PIV humanos heterólogos, tales como HPIV1 y HPIV2, que incorpora además una o más mutaciones ts, ca o att u otras mutaciones seleccionadas de PIV derivados biológicamente (por ejemplo, una sustitución de nucleótido que especifique un fenotipo ts, ca o att adoptado de una cepa de PIV mutante derivada biológicamente, tal como JS cp45). En aspectos más detallados, los genes o segmentos génicos individuales de PIV3 humanos se sustituyen o complementan con genes o segmentos génicos homólogos de HPIV1 o HPIV2, o viceversa, en un clon que se atenúa o se atenúa adicionalmente mediante, por ejemplo, un cambio de nucleótido que codifica una sustitución de aminoácido que confiere una mutación de ts en el gen grande de la polimerasa L. Por ejemplo, la invención proporciona clones de PIV que tienen los genes de glicoproteína HN y/o F de HPIV1 sustituyendo a sus genes homólogos en un fondo HPIV3, en los que el fenotipo del clon quimérico resultante se modifica adicionalmente mediante una mutación o mutaciones ts, ca o att codificadas dentro de uno o más de los genes de N, P, L, M, HN, F, C, D y V. Pueden realizarse diversas combinaciones de un menú de posibles mutaciones descritas en la presente memoria para calibrar un virus vacunal a un nivel seleccionado de atenuación, inmunogenicidad y estabilidad, por ejemplo, para conseguir un virus quimérico inmunogénico y satisfactoriamente atenuado que tenga características inmunológicas representativas de múltiples cepas de PIV. En un aspecto, se proporcionan PIV recombinantes en los que se aparece al menos una mutación atenuante en el gen de la polimerasa L de PIV (como se ejemplifica mediante los recombinantes r942, r992, r1558, r942/992, r942/1558, r992/1558 o r942/992/1558 descritos en los Ejemplos a continuación) incorporados en un fondo de PIV quimérico. Por ejemplo, los recombinantes de PIV quiméricos útiles dentro de este aspecto de la invención tendrán uno o más genes o segmentos génicos de los genes de glicoproteína HN y/o F de, por ejemplo, HPIV1 sustituyendo a su gen o genes homólogos en un fondo heterólogo, por ejemplo, en un clon de HPIV3, e incorporarán además una o más mutaciones atenuantes, por ejemplo, sustituciones de nucleótidos que den como resultado un cambio de aminoácido en el gen de la polimerasa (tal como un cambio de Tyr a His en la posición 942, un cambio de Leu a Phe en la posición 992 y/o un cambio de Thr a Ile en la posición 1558) de un mutante de PIV derivado biológicamente. Un recombinante atenuado quimérico de este tipo ejemplificado a continuación en la presente memoria es rPIV3-1.cp45L, un derivado de rPIV3-1 que incorpora las tres mutaciones del gen de L especificadas anteriormente a partir de JS cp45.

[0069] Otras mutaciones adicionales que pueden incorporarse en un fondo de PIV quimérico para desarrollar cepas vacunales se seleccionarán a partir de mutaciones derivadas biológicamente en otros genes, o se crearán *de novo* en un genoma recombinante por mutagénesis dirigida convencional u otros métodos mutagénicos puramente recombinantes. Los genes diana para adoptar mutaciones derivadas biológicamente o crear nuevas mutaciones en un PIV recombinante en este contexto incluyen la proteína de la nucleocápside N, la fosfoproteína P, la subunidad grande de la polimerasa L, la proteína de la matriz M, la proteína hemaglutinina-neuraminidasa HN, la proteína de fusión F y los productos de las ORF C, D y V. También se fijan como objetivo secuencias extragénicas, por ejemplo, secuencias en las regiones tráiler o líder 3' de un genoma de PIV. Las mutaciones ejemplares identificadas e incorporadas en un PIV recombinante no quimérico descritas anteriormente se incorporarán por lo tanto fácilmente en un fondo de PIV quimérico, por ejemplo, como se ejemplifica mediante rPIV3-1. Estas mutaciones ejemplares incluyen una o más mutaciones en la proteína N, incluyendo mutaciones específicas en una posición que corresponde a los restos Val₉₆ o Ser₃₈₉ de JS cp45. En aspectos más detallados, estas mutaciones se representan como Val₉₆ a Ala o Ser₃₈₉ a Ala. También se desean para su incorporación en recombinantes de PIV quiméricos mutaciones en la proteína C, por ejemplo, una mutación en una posición correspondiente a Ile₉₆ de JS cp45, representada preferentemente por una sustitución de Ile₉₆ a Thr, como se ha descrito anteriormente. Las mutaciones ejemplares adicionales para su incorporación en un fondo de PIV quimérico incluyen una o más mutaciones en la proteína F, por ejemplo, adoptadas de JS cp45 en una posición que corresponde a los restos Ile₄₂₀ o Ala₄₅₀, por ejemplo, sustituciones de Ile₄₂₀ a Val o Ala₄₅₀ a Thr. Otros recombinantes de PIV quiméricos adicionales dentro de la invención adoptarán una o más sustituciones de aminoácidos en la proteína HN, por ejemplo, una mutación en una posición correspondiente al resto Val₃₈₄ de JS cp45, tal como de Val₃₈₄ a Ala. Otros recombinantes quiméricos adicionales incorporarán una o más mutaciones en una secuencia extragénica, por ejemplo, una secuencia líder 3' del genoma o antígeno recombinante. Las mutaciones ejemplares en este contexto incluyen mutaciones en el líder 3' que aparecen en una o más posiciones correspondientes al nucleótido 23, 24, 28 y/o 45 de JS cp45, por ejemplo, un cambio de T a C en el nucleótido 23, un cambio de C a T en el nucleótido 24, un cambio de G a T en el nucleótido 28 o un cambio de T a A en el nucleótido 45. Otras mutaciones extragénicas adicionales para su incorporación dentro de un fondo de PIV quimérico incluyen una o más mutaciones en una secuencia de inicio del gen de N, como se ejemplifica en la presente memoria, por una mutación en la secuencia de inicio del gen de N en una posición correspondiente al nucleótido 62 de JS cp45, tal como un cambio de A a T. Estas mutaciones ejemplares evaluadas y combinadas en un PIV recombinante en los Ejemplos a continuación se incorporarán fácilmente dentro de un recombinante de PIV quimérico usando los métodos y herramientas proporcionados en la presente memoria y especificarán, individualmente y/o en combinación, los cambios fenotípicos deseados para proporcionar otras cepas vacunales quiméricas atenuadas adicionales dentro de la invención.

[0070] En diseños de mutaciones combinatorias adicionales, se proporcionan PIV modificados que incorporan una o más de las mutaciones ts, ca o att anteriores adoptadas de un PIV derivado biológicamente o generadas recombinantemente en un clon de PIV de la invención, en combinación con otra mutación distinta descrita en la presente memoria (por ejemplo, una delección, adición o reorganización de un gen o segmento génico de N, P, L, M, HN, F, C, D o V de PIV, o un gen o segmento génico de otra fuente tal como RSV o virus del sarampión). También en este caso, pueden realizarse diversas combinaciones de un menú de mutaciones descritas en la presente memoria para calibrar el virus vacunal a un nivel seleccionado de atenuación, inmunogenicidad y estabilidad. Por lo tanto, se proporcionan PIV recombinantes que presentan al menos una mutación atenuante de un mutante de PIV de derivado biológicamente, por ejemplo, una mutación en el gen de la polimerasa L de PIV que se encuentra en JS cp45, o una mutación generada recombinantemente, y que incorpora además uno o más cambios adicionales seleccionados de, por ejemplo, sustitución o introducción de un gen o segmento génico heterólogo de una fuente distinta de PIV (por ejemplo, un gen o epítipo de sarampión o RSV inmunogénico, o un gen que codifica una citocina), un cambio en el orden de los genes virales para alterar los niveles de expresión, eliminación de solapamiento de genes, sustitución de un promotor del genoma de PIV con su homólogo de antígeno, acortamiento, aumento de la longitud o eliminación de regiones intergénicas, por ejemplo, para aumentar la capacidad para insertar secuencias extrañas, mutaciones en señales de acción en cis para reducir o aumentar la replicación o transcripción del ARN, inserción de sitios de restricción únicos o delección de genes no esenciales incluso enteros, entre otros cambios.

[0071] Para uso vacunal, el virus producido de acuerdo con la presente invención puede usarse directamente en formulaciones de vacuna o liofilizarse, según se desee, usando protocolos de liofilización bien conocidos por el experto. El virus liofilizado se mantendrá típicamente a aproximadamente 4 °C. Cuando esté listo para usarse, el virus liofilizado se reconstituye en una solución estabilizante, por ejemplo, solución salina o que comprende SPG, Mg⁺⁺ y HEPES, con o sin adyuvante, como se describe adicionalmente a continuación.

[0072] Las vacunas de PIV de la invención contienen como ingrediente activo una cantidad inmunogénicamente eficaz de PIV producido como se describe en la presente memoria. El virus modificado puede introducirse en un hospedador con un vehículo y/o adyuvante fisiológicamente aceptable. Son bien conocidos en la técnica vehículos útiles, 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 como tales, o liofilizadas,

combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración, como se ha mencionado anteriormente. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, 5 cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oelato de trietanolamina, y similares. Los adyuvantes aceptables incluyen adyuvante incompleto de Freund, MPL™ (monofosforil lípido A 3-o-desacilado; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) e IL-12 (Genetics Institute, Cambridge MA), entre muchos otros adyuvantes adecuados bien conocidos en la técnica.

- 10 **[0073]** Tras la inmunización con una composición de PIV como se describe en la presente memoria, mediante aerosol, gota, por vía oral, tópica u otra vía, el sistema inmune del hospedador responde a la vacuna produciendo anticuerpos específicos para proteínas virales de PIV, por ejemplo, glicoproteínas F y HN. Como resultado de la vacunación con una cantidad inmunogénicamente eficaz de PIV producido como se describe en la presente memoria, el hospedador se vuelve al menos parcialmente o completamente inmune a la infección por PIV, o 15 resistente a desarrollar una infección por PIV de moderada o grave, particularmente del tracto respiratorio inferior.

- [0074]** El hospedador al que se administran las vacunas puede ser cualquier mamífero que sea susceptible a la infección por PIV o un virus estrechamente relacionado, y siendo dicho hospedador capaz de generar una respuesta inmune protectora contra los antígenos de la cepa de vacunación. Por consiguiente, la invención proporciona 20 métodos para crear vacunas para una diversidad de usos humanos y veterinarios.

- [0075]** Las composiciones de vacuna que contienen el PIV de la invención se administran a un hospedador susceptible a o de otro modo en riesgo de infección por PIV para aumentar las capacidades de respuesta inmune del propio hospedador. Se define que dicha cantidad es una “dosis inmunogénicamente eficaz”. En este uso, la cantidad 25 exacta de PIV a administrar dentro de una dosis eficaz dependerá del estado de salud y del peso del hospedador, del modo de administración, de la naturaleza de la formulación, etc., pero en general variará de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 unidades formadoras de placas (UFP) o más de virus por hospedador, más comúnmente de aproximadamente 10^4 a 10^5 UFP de virus por hospedador. En cualquier caso, las formulaciones de vacuna deberían proporcionar una cantidad de PIV modificado de la invención suficiente para proteger eficazmente 30 al paciente hospedador frente a una infección por PIV grave o potencialmente mortal.

- [0076]** El PIV producido de acuerdo con la presente invención puede combinarse con virus de otros serotipos o cepas de PIV para conseguir una protección frente a múltiples serotipos o cepas de PIV. Como alternativa, la protección frente a múltiples serotipos o cepas de PIV puede conseguirse combinando epítomos protectores de 35 múltiples serotipos o cepas modificados por ingeniería genética en un virus, como se describe en la presente memoria. Tópicamente, cuando se administran diferentes virus, estarán en una mezcla y se administrarán simultáneamente, pero también pueden administrarse por separado. La inmunización con una cepa puede proteger frente a diferentes cepas del mismo serotipo o de un serotipo diferente.

- 40 **[0077]** En algunos casos puede ser deseable combinar las vacunas de PIV de la invención con vacunas que induzcan respuestas protectoras contra otros agentes, particularmente otros virus infantiles. En otro aspecto de la invención, el PIV puede emplearse como un vector para antígenos protectores de otros patógenos, tales como virus respiratorio sincitial (RSV) o virus del sarampión, incorporando las secuencias que codifican esos antígenos protectores en el genoma o antigenoma de PIV que se usa para producir PIV infecciosos, como se describe en la 45 presente memoria. La clonación de ADNc de RSV y otra descripción relevante para la invención se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente de N° de Serie 08/534.768, 60/021.773, 08/720.132, 60/046.141, 60/047.634, y 08/892.403, y la solicitud de patente PCT PCT/US97/12269.

- [0078]** Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples de las composiciones de vacuna de la 50 invención. En neonatos y lactantes, puede ser necesaria una administración múltiple para generar niveles de inmunidad suficientes. La administración debería comenzar dentro del primer mes de vida, y a intervalos durante toda la niñez, tales como a los dos meses, seis meses, un año y dos años, según sea necesario para mantener niveles de protección suficientes frente a PIV nativo (de tipo silvestre) y/o otras infecciones víricas objeto. De forma similar, los adultos que son particularmente susceptibles a una infección por PIV grave o repetida, por ejemplo los 55 trabajadores de atención sanitaria, los trabajadores de centros de atención de día, los miembros de familias con niños pequeños, las personas mayores y los individuos con una función cardiopulmonar comprometida, pueden requerir múltiples inmunizaciones para establecer y/o mantener respuestas inmunes protectoras.

- [0079]** Los niveles de inmunidad inducida proporcionados por las vacunas de la invención pueden controlarse 60 midiendo las cantidades de anticuerpos séricos y secretores neutralizantes. Basándose en estas mediciones, pueden ajustarse las dosificaciones de vacuna o repetirse las vacunaciones según sea necesario para mantener los niveles de protección deseados. Además, pueden ser ventajosos diferentes virus de vacuna para diferentes grupos de destinatarios. Por ejemplo, una cepa de PIV modificada por ingeniería genética que exprese una proteína

adicional rica en epítomos de células T puede ser particularmente ventajosa para adultos más que para lactantes.

[0080] El PIV de la invención puede emplearse como vector para terapia génica transitoria del tracto respiratorio. De acuerdo con esta realización, el genoma o antígeno de PIV recombinante incorpora una secuencia que es capaz de codificar un producto génico de interés. El producto génico de interés está bajo el control del mismo promotor o de un promotor diferente del que controla la expresión de PIV. El PIV infeccioso producido por coexpresión del genoma o antígeno de PIV recombinante con las proteínas de PIV N, P, L y otras proteínas de PIV deseadas, y que contiene una secuencia que codifica el producto génico de interés, se administra a un paciente. La administración es típicamente por aerosol, nebulizador u otra aplicación tópica en el tracto respiratorio del paciente que se esté tratando. El PIV recombinante se administra en una cantidad suficiente para dar como resultado la expresión de niveles terapéuticos o profilácticos del producto génico deseado. Los productos génicos representativos que pueden administrarse dentro de este método son preferentemente adecuados para una expresión transitoria, incluyendo, por ejemplo, interleucina-2, interleucina-4, interferón-gamma, GM-CSF, G-CSF, eritropoyetina y otras citocinas, glucocerebrosidasa, fenilalanina hidroxilasa, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, citotoxinas, genes supresores de tumores, ARN antisentido y antígenos vacunales.

[0081] El ejemplo siguiente se proporciona a modo de ilustración, no como limitación.

20 **EJEMPLO I**

Construcción del plásmido p218 (131) que codifica ARN genómico de PIV de sentido negativo

[0082] Un clon de ADNc completo denominado p218(131) (Fig. 1; SEC ID N°: 1) (depositado bajo los términos del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos, y al que se le concedió la denominación 97991) se construyó para codificar la secuencia genómica de 15462 nucleótidos completa de la cepa JS de HPIV3. Se puso una ribozima de hepatitis delta contigua al extremo 3' de la secuencia genómica, de modo que la autoescisión produciría el extremo 3' de HPIV3 (Perrotta y Been, Nature 350: 434-436, (1991)).

[0083] Se puso un terminador de la transcripción de T7 después de la ribozima delta. El promotor de T7 se puso adyacente al extremo 5' de la secuencia genómica, de modo que el nucleótido 5'-terminal del genoma de HPIV3 era el primer nucleótido sintetizado. En esta configuración, el ADNc codifica una copia de sentido negativo completa de ARN genómico de PIV3, que contiene el extremo terminal genómico correcto sin ningún nucleótido heterólogo adicional.

[0084] El ADNc de HPIV3 se ensambló a partir de 14 subclones solapantes (denominados A*-L, designando las letras entre paréntesis plásmidos individuales y no refiriéndose a genes virales específicos) construidos por transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ARN aislado de viriones purificados por centrifugación en gradiente de sacarosa (Stokes et al., anteriormente, 1992; Stokes et al., anteriormente, 1993). Los subclones abarcaban los nucleótidos de ARN genómicos siguientes (numerados designando el extremo 3' como posición 1): 1-2058 (A*), 1874-3111 (A'), 3066-5140 (C), 4348-5276 (C'), 5072-6695 (D*), 5904-8532 (E), 7806-9898 (F), 9632-10740 (F'), 9760-10955 (G), 10862-11925 (H), 11835-12868 (I), 12426-13677 (J), 13630-14496 (K) y 14467-15462 (L). Cada fragmento se clonó en pBluescript KSII (Stratagene, La Jolla, CA) usando técnicas de clonación convencionales y se secuenció completamente.

[0085] El plásmido p(L) se sometió después a mutagénesis dirigida para introducir el promotor de T7 mediante un intermedio de ADN monocatenario de acuerdo con el procedimiento MUTA-GENE (BioRad, Hercules, CA)). El promotor de T7 se situó de modo que la transcripción se iniciase en el extremo 5' exacto del genoma de HPIV3 usando el cebador mutagénico de sentido negativo: 5'-AATACGACTCACTATA*ACCAAACAAGAGAAG-3' (SEC ID N°: 2; las secuencias de T7 están en cursiva, las secuencias específicas de HPIV3 están subrayadas y el nucleótido de extremo 5' de HPIV3, la posición genómica 15462, está indicado mediante un asterisco). Este p(L) modificado se denominó p(L*). El plásmido p(E) se modificó para dar p(E*) por el mismo método, usando el oligonucleótido mutagénico de sentido negativo 5'-CCAAGTACTATGAGATGCTTGATT-3' (SEC ID N°: 3) para insertar tres sustituciones de nucleótidos (subrayadas) en el gen de HN en las posiciones 7903, 7913, 7915 de HPIV3 (Fig. 1). Estas sustituciones eliminaron un sitio *Hga* I, insertaron un sitio *Sca* I y modificaron el aminoácido 370 de la proteína HN codificada de modo que se suprimía el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales (mAb) 423/6 y 170/7 (van Wyke Coelingh et al., J. Virol. 61: 1473-1477, (1987)). Los subclones de p(E*) a p(K) se ensamblaron por etapas en el plásmido p(L*) para dar el p(E*FF'GHIJKL*) (Fig. 1A). Este plásmido incluye los nucleótidos 5904-15462 de HPIV3 con el promotor de T7 adyacente al nucleótido 15462 en el extremo 5' del genoma. Los subclones p(A*) a p(E) se ensamblaron en un segundo subclón solapante, p(A*A'CC'D*E), que contenía los nucleótidos 1-8532 de HPIV3.

- [0086]** Ambos subclones p(E*FF'GHIJKL*) y p(A*A'CC'D'E) se secuenciaron completamente. Además de las mutaciones puntuales introducidas descritas anteriormente, el ADNc difería de la secuencia de HPIV3 JS auténtica (Stokes et al., anteriormente, 1992) por la sustitución de un solo nucleótido en la posición 1615, que estaba dentro del gen de N, y que causaba una sustitución en el aminoácido 506 en la proteína codificada. Se encontraron otras tres sustituciones de nucleótidos en las posiciones 10355, 11333 y 15248 en el gen de L que no cambiaban la proteína codificada (Fig. 2). Estos tres cambios no codificantes se conservaron como marcadores de secuencia adicionales para identificar un virus recombinante (denominado rPIV) derivado de ADNc, y la mutación en el gen de N se corrigió como se describe más adelante.
- 10 **[0087]** El subclón p(A*A'CC'D'E) se modificó después para insertar la ribozima del virus de la hepatitis delta y el terminador de T7 adyacentes a la posición 1 del HPIV3. Se construyó previamente un minigenoma de HPIV3, en el que el extremo 3' del genoma de HPIV3 (GGT↓GGG) (subrayado) se generó por autoescisión de una ribozima de antígeno del virus de la hepatitis delta flanqueante (mostrada en parte en negrita) (Dimock y Collins, J. Virol. 67: 2772-2778, (1993); Perrotta y Been, anteriormente, (1991). La ribozima a su vez estaba seguida por un terminador de la transcripción de T7. Este ADNc de minigenoma se usó como molde en una reacción de PCR que modificaba la secuencia adyacente al sitio de escisión de ribozima para que fuera un sitio *Sma* I (CCC↓GGG) y colocaba un sitio *Apal* (GGGCC↓C) en el lado cadena abajo del terminador de T7. El producto de PCR se clonó en pKSII, que se había digerido con *Bss*HI y cuyos extremos se habían hecho romos por rellenado, produciendo el p218.
- 20 **[0088]** El p218 se diseñó de modo que pudiera introducirse cualquier secuencia en el sitio *Sma* I abierto por ligación de extremos romos y su transcrito de ARN se escindiría en el sitio de corte de la ribozima de delta (NNN↓GGG). El subclón de p(A*A'CC'D'E) se dirigió con *Hga* I y *Sal* I (8533), que liberaba el ADNc de HPIV3 y se relleno con dNTP y ADN polimerasa de T4 para dar extremos terminales romos. El sitio *Hga* I está 10 nucleótidos cadena arriba de la posición 1 del HPIV3 y, cuando se digiere y se rellena, deja un extremo terminal romo que comienza con la posición 1 del HPIV3. El fragmento *Hga* I-*Sal* I modificado se purificó en gel y se clonó en el sitio *Sma* I del p218. La mutación en el gen de N (T en el nucleótido 1615) se corrigió con la secuencia wt de JS (A en el nucleótido 1615) (véase el nº de acceso de GenBank Z11575) usando mutagénesis de Kunkel (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154: 367-382, (1987)). Este plásmido se denominó b218(A*A'CC'D'E) (Fig. 1).
- 30 **[0089]** El fragmento *Xho* I-*Ngo* MI de p(E*FF'GHIJKL*), que contenía el promotor de T7 y el ADNc de HPIV3 de los nucleótidos 7438-15462, se clonó en la ventana *Xho* I-*Ngo* MI de p218(A*A'CC'D'E) (Fig. 1). Esto unía los dos fragmentos de ADNc de HPIV3 en el nucleótido 7438 del HPIV3, produciendo un plásmido que contenía un ADNc de HPIV3 de longitud completa que codifica un ARN genómico de sentido negativo con las tres mutaciones deseadas mencionadas anteriormente en el gen de HN y tres mutaciones accidentales en el gen de L. La construcción final, denominada p218 (131) (Fig. 1; SEC ID Nº: 1) se secuenció después en su totalidad mediante secuenciación automática en el NCI Frederick Cancer Research and Development Center (Frederick, MD), usando el kit de secuenciación cíclica Taq DYE Deoxy Terminator (ABI, Foster City, CA). Esto identificó un cambio adicional en el gen de HN, en concreto un cambio de C a T en el gen de HN en la posición 7593, que cambiaba el aminoácido 263 de NH de treonina a isoleucina, que también está indicado en la Fig. 2.

EJEMPLO de referencia II

Sistema de replicación de ARN y transcripción para HPIV3

- 45 **[0090]** El presente ejemplo se proporciona como referencia solamente y describe composiciones y métodos para producir un sistema de replicación de ARN y transcripción reconstituido para un virus parainfluenza humano tipo 3 (HPIV3). Este sistema ejemplar se desarrolló usando componentes expresados intracelularmente a partir de plásmidos transfectados dirigidos por una ARN polimerasa de T7 suministrada por un virus vaccinia recombinante. El sistema se basa en un análogo de sentido negativo de ARN genómico de HPIV3 en el que los genes virales se delecionaron y sustituyeron con un polinucleótido que codifica la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) bacteriana. Las proteínas N, P y L se expresan a partir de plásmidos cotransfectados para dirigir una replicación de ARN y una transcripción eficaces. La transcripción de acuerdo con este ejemplo produce un ARNm poliadenilado subgenómico que puede aislarse fácilmente, por ejemplo, por cromatografía de oligo(dT). La replicación del ARN de acuerdo con este ejemplo produce un miniantigenoma y un minigenoma de progenie, que se muestra que están encapsidados basándose en la resistencia a la digestión con nucleasa microcócica.

A) Virus y células

- 60 **[0091]** Se proporcionó un virus vaccinia recombinante, vTF7-3, que expresa la ARN polimerasa de bacteriófago T7, como se describe por Fuerst et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 8122-8126, 1986.). Se mantuvieron cultivos en monocapa de HEp-2 a 37 °C en CO₂ al 5% con OptiMEM 1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con suero bovino fetal al 2% (FBS), sulfato de gentamicina 50 µg/ml y glutamina 2 mM.

B) ADNc

- [0092]** Los ADNc correspondientes a las ORF de los genes de N, P y L de la cepa JS de HPIV3 (n° GenBank Z11575; Stokes et al., 1992) se clonaron individualmente en la ventana *Nco* I-*Sa* I del plásmido pTM-1, en el que la transcripción está mediada por la ARN polimerasa de T7 y la traducción por un sitio interno de entrada al ribosoma que precede a la ORF extraña (Elroy-Stein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6126-6130 (1989). Cada gen se modificó primero por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para poner un sitio *Nco* I o compatible con *Nco* I en el sitio de inicio de la traducción y un sitio *Sa* I en el extremo cadena abajo.
- 10 **[0093]** El plásmido p(131), que es similar al p218 (131) excepto por que carece de la ribozima del virus de la hepatitis delta, se usó como molde para cada PCR. Los cebadores usados para amplificar la ORF de N eran CCCTATAATTTCAACATGTTGAGCCTATTTG (SEC ID N°: 4; cebador directo respecto al sentido positivo) y GATTAATGTTGGTTCGACTTAGTTGCTTCC (SEC ID N°: 5; la cursiva representa sitios de enzimas de restricción y el sitio de inicio de la traducción está en negrita). El producto de PCR, un fragmento de 1578 pb flanqueado por un sitio *Afl* III y *Sa* I, se clonó en la ventana *Nco* I-*Sa* I del pTM-1 para dar el pTM (N).
- 15 **[0094]** Los cebadores usados para amplificar la ORF de la fosfoproteína (P) de PIV3 eran 5'-CCATAGAGAGTCCATGGAAAGCGATGCTAAAACTATC-3' (SEC ID N°: 6; cebador directo) y 5'-CGGTGTCGTTTCTTTGTCGACTCATTGGCAATTGTTG-3' (SEC ID N°: 7; cebador inverso). Se usó un ADNc de longitud completa de la cepa JS de ARN genómico (p131) como molde para la PCR. El producto de PCR resultante era un fragmento de 1851 pb flanqueado por un sitio de restricción *Nco* I y *Sa* I (en cursiva). El producto de PCR se clonó después en la ventana *Nco* I-*Sa* I de pTM-1 para dar el pTM(P).
- 20 **[0095]** Se realizó una segunda PCR para amplificar la ORF de la fosfoproteína P de PIV3 sin la ORF de C. El p131 se usó de nuevo como ADNc de molde. Se usó un cebador directo diferente y el mismo cebador inverso para amplificar la ORF de P de PIV3 sin C, 5'-CCATAGAGAGTCC**ATGG**AAAGCGACGCTAAAACTATC-3' (SEC ID N°: 74; cebador directo) y 5'-CGGTGTCGTTTCTTTGTCGAGTCATTGGCAATTGTTG-3' (SEC ID N°: 7; cebador inverso). El producto de PCR resultante era un fragmento de 1851 pb flanqueado por un sitio de restricción *Nco* I y *Sa* I (designados mediante cursiva). El nucleótido subrayado en el cebador directo representa una sustitución de nucleótido que es silenciosa en la ORF de P pero cambia el codón de inicio de la ORF de C a treonina. El siguiente codón de inicio para la ORF de C está más de 400 nucleótidos cadena abajo. Por lo tanto, sólo se produciría la proteína P. El producto de PCR se clonó después en la ventana *Nco* I-*Sa* I de pTM-1 para dar una segundo plásmido, pTM(P no C).
- 30 **[0096]** La ORF de L de HPIV3 se clonó en pTM-1 en tres partes: los extremos se obtuvieron de productos de PCR y el cuerpo principal era un fragmento de restricción de p218(131). El extremo cadena arriba de la ORF de L se amplificó usando los cebadores GCAAAGCGTGCCCGGGCC**ATGG**AACTGAATCTAACAATGGC (SEC ID N°: 8) y GAAATTCCTTAATCGATTCTCTAGATTC (SEC ID N°: 9). Esto producía el producto de PCR de 1.020 pb L1, en el que las posiciones 8625-9645 del genoma de longitud completa estaban flanqueadas por sitios *Sma* I y *Nco* I en el extremo cadena arriba y un sitio *Cla* I en el extremo cadena abajo (los tres sitios están en cursiva). El extremo cadena abajo de la ORF de L se amplificó usando los cebadores CCCATCAACTGTAACA**TACGTA**AGAAAGAC (SEC ID N°: 10) y GGTTAGGATATGTCGACATTGTATTATG (SEC ID N°: 11). Esto producía el producto de PCR de 1.733 pb L2, en el que las posiciones 13, 645-15, 378 del genoma de longitud completa estaban flanqueadas por un sitio *Sna* B I y *Sa* I (en cursiva). El plásmido p (131) se digirió con *Cla* I y *Pst* I para dar el fragmento de 4.487 pb L medio, que contiene las posiciones 9.630-14.120 del genoma de longitud completa. El L1 y el L medio se unieron en el sitio *Cla* I común y se clonaron en la ventana *Sma* I-*Pst* I de pBluescript para dar el p(L1+L middle). El fragmento L2 se clonó después en la ventana *Pst*-*Sa* I de p(L1+L middle) para dar la ORF de L completa flanqueada por *Nco* I y *Sa* I. Esto se clonó después en la ventana *Nco* I-*Sa* I de pTM-1 para dar el pTM (L). Las secuencias de las regiones generadas por PCR de pTM(N) (SEC ID N°: 20), pTM(P) (SEC ID N°: 21) y pTM (L) (SEC ID N°: 22) se confirmaron mediante el método de secuenciación con didesoxinucleótidos.
- 40 **[0097]** Para aumentar la eficacia de la transcripción de T7 se realizaron ciertas modificaciones en una construcción de ADNc que codifica un minigenoma de PIV de sentido negativo denominado PIV3-CAT(-) (Dimock y Collins, J. Virol. 67: 2772-2778 (1993)). El PIV3-CAT(-) incluye los 111 nucleótidos 3'-terminales y los 115 nucleótidos 5'-terminales del genoma de HPIV3 fusionados a una copia de sentido negativo de la ORF de CAT. Este ADNc estaba diseñado para dar, tras la linealización con *Hga* I y la transcripción con ARN polimerasa de T7, un minigenoma que contenía los extremos correctos exactos del genoma de HPIV3. Se usaron dos rondas sucesivas de PCR usando oligonucleótidos mutagénicos (que añadían extensiones sucesivas al extremo de ADNc) para sustituir el sitio *Hga* I con la ribozima de la hepatitis delta (Perotta y Been, Nature 350: 434-436 (1991)), de modo que la autoescisión genera el extremo genómico de HPIV3 3' correcto. Se insertó una señal de terminación de la transcripción de T7 inmediatamente después de la ribozima (Fig. 3) para dar el PIV3-CAT-delta.
- 50 **[0098]** Se modificó el ADNc de PIV3-CAT-delta mediante mutagénesis por PCR para insertar uno, dos o tres

restos G entre el promotor de T7 y el extremo 5' del minigenoma, usando sitios de restricción que flanquean el tráiler y el promotor de T7. Esta modificación producía una eficacia aumentada de la transcripción de T7. En experimentos preliminares, el minigenoma que contenía dos restos G, denominado PIV3-CAT-GG, era el más activo en la expresión de CAT en el sistema de replicación y transcripción reconstituido descrito a continuación, y se usó para todos los derivados posteriores.

[0099] El ADNc de PIV3-CAT-GG se modificó adicionalmente mediante mutagénesis por PCR solapante para introducir modificaciones simultáneamente en dos sitios, de la forma siguiente. En primer lugar, la secuencia T₇CT, que contiene los motivos de terminación de la transcripción en tándem para la ARN polimerasa de fase temprana de virus vaccinia (T₅NT) (Yuen y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 6417-6421 (1987)), se insertó en la cadena de ADNc de cadena de sentido positivo entre la ribozima de delta y el terminador de la transcripción de T7 (Fig. 1). Este motivo, y un segundo motivo descrito a continuación en la presente memoria, se añadieron para evitar una transcripción promiscua del gen de CAT por la ARN polimerasa temprana de virus vaccinia. En segundo lugar, el inserto de ADNc de minigenoma se modificó en la unión entre la región no traducida de N y el gen de CAT para que contuviera (i) la inserción de un segundo motivo de terminación de virus vaccinia (T₅AT) en la cadena de ADNc de sentido positivo en las posiciones 103 a 109 respecto al minigenoma codificado, y (ii) la inserción de 0 a 6 restos G (sentido negativo) en la posición 112 del minigenoma (Fig. 3). La mutagénesis por PCR solapante implicaba tres conjuntos de reacciones (PCR 1, 2 y 3) realizadas de la forma siguiente. La PCR 1 era un conjunto de siete reacciones en paralelo [PCR1 (0) a (+6)] que usaban el ADNc de PIV3-CAT-GG como molde y los dos oligonucleótidos mutagénicos siguientes como cebadores: el cebador directo era ⁻¹¹¹G G G G T T A T G C T A C T G C A G G C T T T T T T C T C C C T T A G C C A T C C G⁻⁶² (SEC ID N°: 12) y el cebador inverso era: ¹²⁴C T C C A T T C T A G A (N) T T A T A A A A A T T A T A G A G T T C C C⁹⁰ (SEC ID N°: 13). La secuencia en negrita en el primer oligonucleótido es el terminador de vaccinia en tándem cadena arriba, y la secuencia en negrita en el segundo oligonucleótido es el segundo terminador. Esta reacción amplificaba la ribozima y la región líder adyacente e insertaba las mutaciones descritas anteriormente. La PCR 2 era una sola reacción que usaba el ADNc de PIV3-CAT-GG como molde, y un cebador directo que hibridaba en la secuencia del plásmido cadena arriba de un sitio *Ngo*MI único (Fig. 3), y un cebador inverso complementario al cebador directo de la reacción uno. Por lo tanto, los productos de PCR 1 y 2 solapaban en esta última secuencia. Los productos de PCR 1 (0) a (+6) y PCR 2 se purificaron en gel. Los productos de PCR1 (0) a (+6) se mezclaron cada uno por separado con una alícuota de producto de PCR 2 y se amplificaron en una tercera reacción (PCR3 (0) a (+6)) que también contenía el cebador directo de la PCR 2 y el cebador inverso de la PCR 1. Los productos de PCR3 (0) a (+6) se digirieron con *Ngo*MI, que corta en una secuencia específica de plásmido, y *Xba*I, que corta en el extremo cadena arriba del gen de CAT (Fig. 3), y se clonaron en la ventana *Ngo*MI-*Xba*I de PIV3-CAT-GG. Esto dio como resultado un panel de ADNc que codifican minigenomas que se denominaron de acuerdo con el número de restos G insertados: PIV3-CAT 0 a PIV3-CAT +6. Las estructuras de todas las regiones de ADN obtenidas por PCR se confirmaron mediante secuenciación con dideoxinucleótidos.

C) Transfección

[0100] Se cultivaron células HEp-2 hasta una confluencia del 90% en placas de 6 pocillos. Cada pocillo de una placa de seis pocillos (1,5 X 10⁶ células) se transfectó con 0,4 µg de pTM (P), 0,4 µg de pTM (N), 0,05 µg de pTM (L) y 0,4 µg de plásmido de minigenoma. Los plásmidos se añadieron a 0,1 ml de OptiMEM (Life Technologies) y se mezclaron con 0,1 ml de OptiMEM que contenía 12 µl de LipofectACE (Life Technologies). Después de un periodo de incubación de aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 0,8 ml de OptiMEM 1 que contenía suero de ternera al 2% y 1,5 X 10⁷ ufp de vTF7-3 a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas, después de las cuales los medios se sustituyeron con OptiMEM 1 fresco que contenía suero bovino fetal al 2%. Las células se incubaron después a 37 °C durante un total de 48 horas y se recogieron para análisis de ARN y ensayo de CAT. Cada minigenoma estaba representado por triplicado (3 pocillos) que se rasparon hacia el medio y se combinaron.

D) Ensayo de CAT

[0101] Se retiró una alícuota que representaba el 3,33% (1,5 x 10⁵ células) de cada muestra combinada de células recogidas descrita anteriormente para ensayo de CAT. La alícuota se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La suspensión celular se lavó con 1 ml de Tris 40 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y se resuspendió en 50 µl de Tris 0,25 M, pH 7,5. Se preparó un lisado mediante tres ciclos de congelación y descongelación y se aclaró por centrifugación a 8.000 rpm durante 5 minutos. Se ensayó 1 µl de lisado para determinar la capacidad para acetilar D-treo-[dicloroacetil 1-¹⁴C]cloranfenicol (Amersham) usando un ensayo convencional (Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051 (1982)). La acetilación se visualizó por cromatografía en capa fina y se cuantificó por análisis de Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

E) Análisis de ARN

[0102] La recolección de células restante de cada muestra combinada se dividió en tres partes iguales para el aislamiento de ARN encapsidado, ARN total y ARNm. Las tres alícuotas se centrifugaron a 1.000 rpm durante cinco minutos y los sobrenadantes se desecharon. Se resuspendieron dos alícuotas de suspensión celular en 50 µl de RSB (NaCl 10 mM, Tris 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1,5 mM) que contenía Triton X-100 al 1%, DOC al 0,5%. Después se añadieron a una alícuota 50 µl de Tris 7,5 10 mM, CaCl₂ 1 mM y 20 µg (solución madre 1 mg/ml) de nucleasa microcócica, y la otra recibió la misma mezcla sin nucleasa microcócica (Baker y Moyer, J. Virol. 62: 834-838 (1988)). El propósito de la nucleasa microcócica era destruir el ARN no encapsidado y las condiciones usadas se habían optimizado en experimentos preliminares. Las mezclas se incubaron a 30 °C durante 30 min y el ARN se aisló con Trizol (Life Technologies) de acuerdo con el procedimiento del proveedor. La tercera alícuota de suspensión celular se procesó para la purificación del ARN con Trizol y el ARN purificado se separó mediante cromatografía de oligo(dT) celulosa en fracciones poliadenilada y no poliadenilada (Grosfeld et al., J. Virol. 69: 5677-5686 (1995)). Las muestras de ARN se procesaron en geles de agarosa al 1,5% que contenían formaldehído 0,44 M, se transfirieron a nitrocelulosa (Chomczynski, Anal. Biochem. 201: 134-139 (1992)), se hibridaron con ribosondas específicas de cadena y se cuantificaron mediante análisis de Phosphorimager.

EJEMPLO de referencia III20 Construcción y expresión de minigenomas de PIV3 modificados

[0103] En el presente ejemplo, que se proporciona como referencia solamente, se construyó un panel de ADNc para codificar minigenomas de PIV3 que diferían en longitud por incrementos de un solo nucleótido. La replicación de ARN y la transcripción en este sistema reconstituido eran las más eficaces para el minigenoma cuya longitud era un múltiplo par de seis. En este contexto, los miembros de los géneros *Paramyxovirus* y *Morbillivirus* típicamente se ajustan a una “regla de seis”, es decir, los genomas (o minigenomas) se replican eficazmente sólo cuando su longitud de nucleótidos es un múltiplo de seis (se cree que es un requisito para un espaciado preciso de los restos nucleotídicos respecto a la proteína NP encapsidante). Sin embargo, los presentes descubrimientos ilustran que minigenomas cuyas longitudes eran de un nucleótido más o menos que un múltiplo par de seis eran sorprendentemente activos, especialmente en la replicación del ARN.

[0104] Se construyó un panel de siete ADNc para codificar siete minigenomas de PIV3-CAT, denominados PIV3-CAT 0 a +6, que difieren en longitud por incrementos de un solo nucleótido (Fig. 3). Cada minigenoma es un análogo de sentido negativo corto de ARN genómico de HPIV3 en el que los genes virales se han eliminado y sustituido con una copia de sentido negativo de la ORF de CAT. La ORF de CAT está flanqueada por segmentos no traducidos de los genes de N y L, los motivos de transcripción GS de N y GE de L y los extremos terminales extragénicos líder 3' y trailer 5' del ARN genómico. El extremo 5' de cada minigenoma de PIV3-CAT está definido por el promotor adyacente para la ARN polimerasa de T7. Este promotor se construyó para contribuir a una extensión de dos restos G no virales en el extremo 5' del minigenoma codificado, como se ha descrito anteriormente. La presencia de restos G adicionales adyacentes al núcleo no transcrito del promotor de T7 mejora su eficacia de transcripción, y trabajos preliminares demostraron que la presencia de dos restos G proporcionaba los mayores niveles de actividad en el sistema reconstituido descrito a continuación. Estos dos restos G no están incluidos en los cálculos de longitud del minigenoma. El extremo de minigenoma 3' se crea por autoescisión mediante una ribozima de virus de la hepatitis delta contigua, que generaría el nucleótido 3'-terminal correcto. Los siete minigenomas de PIV3-CAT difieren por incrementos de un solo nucleótido en la longitud debido a la inserción de 0 a 6 restos G en la unión entre la región no traducida de N y el gen de CAT (Fig. 3) y varían en longitud de 898 a 904 nucleótidos. El minigenoma de PIV3-CAT +2 es el único que es un múltiplo par de seis (debería señalarse que cada minigenoma contenía dos restos G no virales adicionales en el extremo 5' aportados por el promotor de T7, pero se asume que estos se perderían durante la replicación del ARN mediada por HPIV3 intracelular).

[0105] Cada ADNc de PIV3-CAT se usó para transfectar células HEp-2 que se habían infectado con vTF7-3, un virus vaccina recombinante que expresa la ARN polimerasa de T7. Los plásmidos que codifican las proteínas N, P y L bajo el control del promotor de T7 se transfectaron en paralelo. El ADNc de P se había modificado por mutagénesis dirigida para eliminar el sitio de inicio de la traducción de la ORF de C, como se ha descrito anteriormente. Las células se recogieron a las 48 h post-infección. Se procesó una alícuota de la suspensión celular para ensayo enzimático de CAT (Fig. 4). Las células restantes se dividieron en tres alícuotas iguales y se procesaron para el análisis del ARN como se describe a continuación.

[0106] El ADNc de minigenoma se modificó adicionalmente para contener dos motivos de terminación de la transcripción del gen temprano de virus vaccina en tándem (T₇NT) en la cadena de plásmido de sentido positivo cadena arriba del inserto de PIV3-CAT, y un tercero (T₅AT) en la misma cadena inmediatamente cadena arriba de la ORF de CAT. Estos estaban diseñados para minimizar la transcripción promiscua de la ORF de CAT por polimerasa de virus vaccinia (Grosfeld et al. (1995) anteriormente). La expresión de CAT se detectaba de forma reproducible

cuando cada uno de los minigenomas de PIV3-CAT estaba complementado por los plásmidos N, P y L (Fig. 4) y la detección de CAT dependía de las tres proteínas de PIV3. Sin embargo, la expresión era mucho mayor para PIV3-CAT+2, que tiene una longitud de nucleótidos que es un múltiplo par de seis. Se determinaron las proporciones y cantidades preferidas del minigenoma y plásmidos de soporte basándose en la expresión enzimática de CAT.

5

EJEMPLO de referencia IV

Síntesis de ARN de sentido positivo por minigenomas de PIV

10 **[0107]** La transcripción y la replicación de minigenomas de PIV se confirmó en este ejemplo, que se proporciona como referencia solamente, por detección de productos de ARN de ambos procedimientos. Como se ha descrito en el Ejemplo anterior, se tomaron tres alícuotas iguales de suspensión celular para el análisis de ARN. Se usó una alícuota para análisis de oligo(dT), como se describe a continuación. Las otras dos alícuotas se lisaron con detergente y se incubaron con nucleasa microcócica o se realizó un tratamiento simulado. Después, el ARN se aisló, se separó por electroforesis en geles de agarosa con formaldehído, se transfirió a nitrocelulosa y se analizó mediante hibridación con una ribosonda de CAT de sentido negativo. El ARN de lisados tratados con nucleasa microcócica y con tratamientos simulados se muestra en los paneles superior e inferior de la Fig. 5A, respectivamente.

20 **[0108]** El análisis de ARN de lisados con tratamiento simulado mostró que la complementación de cada minigenoma con los plásmidos N, P y L daba como resultado la síntesis de una banda de ARN que era muy similar en tamaño a un marcador que consistía en ARN expresado por el minigenoma RSV-CAT C2 de 931 nucleótidos (Grosfeld et al. (1995), anteriormente). El análisis de Phosphorimager se muestra en la Fig. 5B. Se detectó poco o nada de ARN cuando se omitían los plásmidos N o L, confirmando que estos ARN son productos de la polimerasa de PIV3 reconstituida.

25 **[0109]** Se espera que cada minigenoma de PIV3-CAT codifique dos ARN de sentido positivo, en concreto el ARNm de CAT subgenómico y miniantigenoma. Se espera que cada miniantigenoma sea el complementario exacto de su minigenoma, que tenía una longitud de 898 a 904 nucleótidos. El ARNm subgenómico esperado está definido por las señales GS y GE, y se espera que sea de 804 nucleótidos de longitud y contenga una cola poliA de 100 a 200 nucleótidos.

35 **[0110]** La detección de una sola banda de gel de ARN de sentido positivo en la Fig. 5A (panel inferior) sugería que el antigenoma y el ARNm no se resolvían por electroforesis en gel. Por consiguiente, el tratamiento con nucleasa microcócica se usó para identificar el ARN de antigenoma, puesto que el antigenoma (y el genoma), pero no el ARNm, estarían encapsidados y serían resistentes a la digestión. El uso de nucleasa microcócica con este fin está bien establecido (Baker y Moyer (1988), anteriormente) y las condiciones seleccionadas se verificaron con minirreplicones de RSV y demostraron degradar completamente el ARNm contenido en los lisados de células HEP-2. El ARN residual se purificó y se analizó mediante análisis de transferencia de Northern con una ribosonda de sentido negativo (Fig. 5A, panel superior) y se cuantificó mediante Phosphorimager (Fig. 5B; obsérvese que en este análisis las cantidades de ARN tratado con nucleasa microcócica y no tratado se normalizaron por separado). Estas investigaciones pusieron de manifiesto la presencia de una población de ARN protegido que correspondía al miniantigenoma encapsidado de sentido positivo. Entre varios experimentos, este ARN protegido representaba aproximadamente del 3 al 15% del ARN de sentido positivo.

45 **[0111]** Tanto para el ARN total como el resistente a nucleasa microcócica, la acumulación era mayor en el caso del minigenoma +2, que tiene una longitud de 900 nucleótidos y, por lo tanto, es un múltiplo de seis. Sin embargo, también se acumularon cantidades importantes de ARN en el caso de los minigenomas que no mostraban una longitud correspondiente a un múltiplo de seis nucleótidos, en particular los minigenomas +1 y +3, que eran un nucleótido más largos o más cortos que el minigenoma +2. De hecho, la cantidad de antigenoma encapsidado producido por los minigenomas +1 y +3 era del 85% y del 72% el del minigenoma +2 (Fig. 5B). Incluso el minigenoma de menos eficaz, el minigenoma +5, era el 20% tan activo como el minigenoma +2, según se determinó por medición del ARN encapsidado acumulado. En el caso de mediciones para detectar el ARN de sentido positivo total, los minigenomas +1 y +3 producían el 52% y el 45% tanto ARN total como el minigenoma +2.

55 **[0112]** Para confirmar la presencia de ARNm subgenómico, la alícuota final de suspensión celular recogida se procesó para la purificación del ARN. El ARN se sometió después a cromatografía de oligo (dT). Los ARN que no se unieron y los que se unieron y se eluyeron en tampón de baja concentración de sal se analizaron mediante hibridación de transferencia de Northern (Fig. 6A) y Phosphorimager (Fig. 6B; obsérvese que en este caso el unido y el no unido se normalizaron juntos respecto al ARN unido del minigenoma +2). Estos ensayos mostraban que aproximadamente el 64% del ARN de sentido positivo estaba poliadenilado, como se esperaba para el ARN subgenómico. La acumulación de ARNm era superior para el minigenoma +2. Sin embargo, también se observaron cantidades sustanciales de ARNm para los otros minigenomas. La cantidad de ARN sintetizado por los minigenomas

60

+1 y +3 era del 30% y del 20%, respectivamente, en comparación con el sintetizado por el minigenoma +2, y era aproximadamente del 13% para los minigenomas menos activos.

EJEMPLO de referencia V

5

Síntesis de ARN de sentido negativo por minigenomas de PIV

[0113] Este ejemplo se proporciona solamente como referencia.

- 10 **[0114]** Los diversos minigenomas de PIV3-CAT descritos en los ejemplos anteriores dirigían la síntesis de ARNm y miniantigenoma encapsidado de sentido positivo, representando este último la primera etapa en la replicación del ARN. La segunda etapa en la replicación del ARN implica la síntesis de un minigenoma de progenie encapsidado a partir del producto de miniantigenoma. Para evaluar este último procedimiento, las muestras de ARN de lisados con tratamiento simulado y con tratamiento con nucleasa descritos en el Ejemplo anterior se analizaron mediante
- 15 hibridación de transferencia de Northern con ribosonda de CAT de sentido positivo (Fig. 7A) y se cuantificaron mediante Phosphorimager (Fig. 7B).

- [0115]** El análisis de ARN de lisados con tratamiento simulado (Fig. 7A, panel inferior) mostró que se acumulaban intracelularmente cantidades considerables de minigenoma en todas las muestras, incluyendo controles negativos
- 20 en los que se omitía el plásmido de soporte N o L. Los análisis descritos en las Figs. 5A-B y 6A-B mostraron que la síntesis de ARN de sentido positivo era insignificante en estas condiciones. Por lo tanto, el minigenoma observado en ausencia de N o L no podía ser el producto de la replicación de ARN mediada por la polimerasa de HPIV3 reconstituida, y en su lugar debe ser el producto de la transcripción de T7 del plásmido transfectado.

- 25 **[0116]** Se espera que el minigenoma producido por la polimerasa de HPIV3 reconstituida esté encapsidado, mientras que se espera que gran parte del minigenoma producido por ARN polimerasa de T7 no esté encapsidado. Por lo tanto, el ARN de las mismas muestras tratadas con nucleasa microcócica descritas para las Figs. 5A-5B se usó para preparar una segunda transferencia, que se hibridó con una ribosonda de CAT de sentido positivo (Fig. 7A, panel superior). Esto demostró que todo el ARN de minigenoma acumulado en ausencia de la proteína N se
- 30 degradaba (Fig. 7A, panel superior, carril 1), como se esperaba. Esencialmente todo el minigenoma que se acumulaba en ausencia de L también era sensible a la degradación (Fig. 7A, panel superior, carril 2). El minigenoma derivado de plásmido sintetizado en ausencia de L y en presencia de N y P solamente no parecía producirse eficazmente.

- 35 **[0117]** Cuando estaba presente el conjunto completo de tres plásmidos de soporte, se acumulaban cantidades significativas de ARN de minigenoma resistente a nucleasa microcócica para cada uno de los minigenomas (Fig. 7A, panel superior). Como era el caso con los ARN de sentido positivo, la mayor cantidad de minigenoma de progenie se observaba con el minigenoma +2. Los minigenomas +1 y +3 eran los siguientes en abundancia, con niveles de ARN genómico que eran del 67% y del 42% el del minigenoma +2.

40

- [0118]** Los ejemplos anteriores demuestran que las proteínas N, P y L de HPIV3 eran necesarias y suficientes para una transcripción y replicación de ARN eficaz. La naturaleza muy robusta de la transcripción y replicación de ARN mediada por la polimerasa de PIV3 reconstituida confirmó la funcionalidad de las proteínas codificadas. Se espera además que la inclusión de proteínas virales adicionales dentro del sistema de expresión aumente o modifique estos
- 45 procedimientos. La coexpresión de C, D y potencialmente V de PIV dentro de las composiciones y métodos de la invención será útil, por ejemplo, para aumentar y/o modificar la replicación del ARN. Con este fin, se construirán y se ensayarán plásmidos de acuerdo con los métodos anteriores para conseguir la coexpresión de uno o más de estos elementos para determinar sus efectos sobre la transcripción y replicación del ARN de PIV, así como sobre el fenotipo de PIV en modelos de infección adecuados.

50

EJEMPLO VI

Construcción de PIV recombinante infeccioso a partir de ADNc

- 55 **[0119]** Los ejemplos siguientes describen la producción de PIV recombinante infeccioso (rPIV) por coexpresión intracelular de cuatro ADNc incluidos en plásmidos. Estos ADNc codifican por separado un genoma de HPIV3 completo y la proteína de la nucleocápside N, la fosfoproteína P y la proteína polimerasa L de HPIV3.

A) Virus y células

60

- [0120]** Se proporcionó la cepa de vaccinia modificada Ankara (MVA), el virus vaccinia recombinante que expresa la ARN polimerasa de bacteriófago T7, de acuerdo con Wyatt et al., Virol. 210: 202-205, 1995.

[0121] Se mantuvieron cultivos en monocapa de HEp-2 a 37 °C en CO₂ al 5% con OptiMEM 1 (Life Technologies) complementado con FBS al 2%, sulfato de gentamicina 50 µg/ml y glutamina 2 mM. La cepa JS wt de HPIV3 y su derivado ts atenuado, JS *cp45*, se propagaron en células LLC-MK2 como se describe por Hall et al., Virus Res. 22: 173-184, (1992).

5

B) ADNc

[0122] El clon de ADNc completo denominado p218(131) (Fig. 1, SEC ID N°: 1) que codifica una secuencia genómica completa de HPIV3 se construyó como se ha descrito anteriormente. Un segundo clon de ADNc
10 denominado p3/7(131) (SEC ID N°: 14) (depositado bajo los términos del Tratado de Budapest en la ATCC y al que se le concedió la denominación 97990) se construyó para codificar una secuencia antigenómica completa de HPIV3. El p3/7(131) difiere del p218(131) en que las posiciones del promotor de T7 y de la ribozima/terminador de T7 respecto al inserto de ADNc de HPIV3 se han intercambiado. Por lo tanto, el primer nucleótido sintetizado en p3/7 (131) es el extremo 5' del antigenoma, en concreto el complementario de sentido positivo de la posición 1 del
15 genoma, y el extremo del antigenoma 3' definido por la escisión de la ribozima es el complementario de la posición del genoma 15462. Un tercer clon denominado p3/7(131)2G (SEC ID N°: 15) depositado bajo los términos del Tratado de Budapest en la ATCC y al que se le concedió la denominación 97989) se construyó también idéntico a p3/7(131), excepto por que se insertaron dos restos G entre el extremo 5' del antigenoma y el promotor de T7.

20 [0123] Para la construcción de p3/7(131)2G y p3/7(131), los dos plásmidos p(A*A'CC'D'E) y p(E*FF'GHIJKL*) se modificaron y se unieron para codificar el antigenoma de sentido positivo completo de HPIV3. En primer lugar, el terminador de T7 y la ribozima de delta contiguos al extremo 3' de HPIV3 en p(A*A'CC'D'E) se sustituyeron por un promotor de T7 usando PCR (véase la Fig. 8). El cebador de sentido positivo 5'-GGCCCGTCGACGCGTAATACGACTCACTATAGGACCAACAAGAG-3' (SEC ID N°: 18) puso el promotor de T7
25 (negrita) adyacente al líder 3' de HPIV3 (secuencia de HPIV3 subrayada) con 2 restos G insertados entre estos dos elementos para mejorar la transcripción. Se puso un sitio *Mlu* I único (en cursiva) cadena arriba del promotor de T7 para fines de clonación (Fig. 8). El cebador de sentido negativo 5'-¹²²⁴CGGCATCACGTGCTAC¹²⁰⁹-3' (SEC ID N°: 19) abarcaba los nucleótidos 1209-1224 del gen de N de HPIV3 e incluía un sitio *Pml* I único (en cursiva) presente en la secuencia de HPIV3 natural. Tanto el producto de PCR como el molde parental p218 (A*A'CC'D'E) se
30 digirieron con *Mlu* I y *Pml* I y el producto de PCR se clonó después en la ventana *Mlu* I-*Pml* I. Se realizó una segunda reacción de PCR usando el mismo cebador de sentido negativo y un cebador de sentido positivo sin restos 2G insertados entre el promotor de T7 y el extremo 3' de HPIV3. Estos plásmidos se denominaron p(Left + 2G) y p(Left +). La construcción de p(Left + 2G) se ilustra en la Fig. 8, y la construcción de p(Left +) siguió la misma estrategia.

35 [0124] El plásmido p(E*FF'GHIJKL*) se modificó por PCR para colocar la ribozima de delta y el terminador de T7 adyacentes al extremo 5' de HPIV3 (Fig. 9). El cebador de sentido positivo: 5'GATTTGCGCGC¹⁴⁸¹³AATTTAAATCATCTGG¹⁴⁸²⁸-3' (SEC ID N°: 16) introducía un sitio *BssH* II (en cursiva) justo cadena arriba de un sitio *Swa* I único (en cursiva, subrayado) en el gen de L de HPIV3 (la secuencia específica de HPIV3 está subrayada). El cebador de sentido negativo: 5'-
40 CCCAGGTCGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCAGCCC¹⁵⁴³⁵ACCAAAACAAGAGAAGAACTCTGTTTGG¹⁵⁴³⁵-3' (SEC ID N°: 17) ponía una porción de la ribozima de delta (negrita) que incluía un sitio *Rsr* II único de origen natural (en cursiva) adyacente al extremo 5' del genoma de HPIV3 (de sentido negativo subrayado). Este producto de PCR se dirigió con *BssH* II y *Rsr* II y se clonó en la ventana de *BssH* II-*Rsr* II del plásmido p3/7 (Fig. 9). El plásmido p3/7 es idéntico a p218 excepto por que la ribozima de delta y el terminador de T7 están en la orientación
45 inversa. El plásmido p3/7 que contiene la inserción mencionada anteriormente se denominó pPIV3-3/7 y contenía la ribozima de delta y el terminador de T7 completos adyacentes a los 651 nucleótidos 5'-terminales de HPIV3. El fragmento de *Swa* I y el *NgoM* I del plásmido pPIV3-3/7 se aislaron después y se clonaron en la ventana *Swa* I-*NgoM* I de p(E*FF'GHIJKL*). El plásmido resultante, denominado p(Right +) puso la ribozima de delta y el terminador de T7 completos adyacentes al extremo 5' de HPIV3 (véase la Fig. 9). El fragmento *Xho* I-*NgoM* I de p(Right +) se clonó en
50 la ventana *Xho* I-*NgoM* I de p(Left +) y p(Left + 2G), dando como resultado los plásmidos p3/7(131) (SEC ID N°: 14) y p3/7(131 2G) (SEC ID N°: 15), respectivamente (Fig. 10). Estos codifican cada uno el análogo de sentido positivo completo de ARN antigenómico de HPIV3, conteniendo el último ADNc dos restos G adyacentes al promotor de T7 para una eficacia de transcripción mejorada.

55 C) Transfección

[0125] Se cultivaron células HEp-2 hasta una confluencia del 90% en placas de seis pocillos. Cada pocillo de una placa de seis pocillos (1,5 X 10⁶ células) se transfectó con los tres plásmidos de soporte descritos anteriormente, 0,4 µg de pTM (P), 0,4 µg de pTM (N), 0,05 µg de pTM (L), junto con 5 µg de ADNc de HPIV3 genómico o antigenómico
60 de longitud completa. Los plásmidos se añadieron a 0,2 ml de OptiMEM 1 (Life Technologies) que contenía 12 µl de LipofectACE (Life Technologies). Después de un periodo de incubación de aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 0,8 ml de OptiMEM 1 que contenía suero bovino fetal al 2% y 1,5 X 10⁷ ufp de MVA-T7 a cada pocillo. Los cultivos se incubaron a 32 °C durante 12 horas, después de las cuales los medios se

sustituyeron con OptiMEM 1 fresco que contenía suero bovino fetal al 2%. Los cultivos se incubaron a 32 °C durante tres días adicionales, después se recogieron y se pasaron (denominado pase 1) sobre monocapas de HEp-2 recién preparadas. Estos cultivos de pase 1 se incubaron a 32 °C durante cinco días, y los virus presentes en el cultivo se recogieron, se pasaron una vez en cultivos de LLC-MK2 y se caracterizaron por inhibición de la hemaglutinación (HAI) como se describe (van Wyke Coelingh et al., Virol. 143: 569-582, (1985)) para determinar si poseían la mutación resistente a anticuerpos monoclonales (MARM) que marcaba el virus recuperado a partir de ADNc.

D) Secuenciación de virus recombinante

10 **[0126]** La presencia de marcadores de secuencia de nucleótidos en los genes de HN y L de PIV recombinante se determinó por RT-PCR de ARN aislado de viriones recuperados. Se precipitó 1 ml de rPIV (1 X 10⁵ ufp/ml, nivel de pase 2) con 200 µl de polietilenglicol al 25% por incubación en hielo durante una hora y centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. El ARN se purificó con reactivo TRIzol (Life Technologies) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Se realizó una RT-PCR con el kit Superscript (Life Technologies) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las reacciones de control eran idénticas excepto por que se omitió la transcriptasa inversa de la reacción para confirmar que los productos de PCR procedían únicamente de ARN del virus y no de posibles plásmidos de ADNc contaminantes. Se usaron cuatro parejas de cebadores para generar productos de PCR a partir de los nucleótidos 7334-8715, 9364-10854, 10939-15392 y 13623-15392. Los productos de PCR resultantes se secuenciaron después usando análisis de secuencia cíclico con didesoxinucleótidos (New England Biolabs, Beverly, MA).

EJEMPLO VII

Recuperación de virus recombinante a partir de ADNc que codifica ARN genómico de sentido negativo

25 **[0127]** El plásmido p218(131) y los tres plásmidos de soporte pTM(N), pTM(P) y pTM (L) se usaron para transfectar células HEp-2 con MVA que expresa la ARN polimerasa de T7. Un grupo de control que consistía en pTM(N), pTM(P), pTM(L) y MVA se cotransfectó en células HEp-2 sin p218(131). El día cuatro, la transfección se recogió, se pasó sobre monocapas de células HEp-2 recién preparadas durante cinco días y se pasó de nuevo durante 5 días en cultivos de LLC-MK2 (pase 2). El virus presente en la recolección del pase 2 se caracterizó adicionalmente mediante HAI. Los cultivos del grupo de transfección que recibió los tres plásmidos de soporte sin el clon genómico de longitud completa p218(131) no produjeron HPIV3. Se confirmó que el virus recuperado rPIV era HPIV3 puesto que reaccionaba en el ensayo de HAI con los mAb 77/5, 101/1 y 454/11, que son específicos para HPIV3 (Tabla 1). Se identificó presuntamente que procedía de ADNc porque no reaccionaba con los mAb 170/7 y 423/6, lo que concuerda con la mutación MARM que se había introducido en el ADNc.

TABLA 1

rJS-NS contiene la mutación MARM introducida en el ADNc de sentido negativo de longitud completa p218(131) (Inversa) del título de anticuerpo inhibidor de la hemaglutinación del mAb indicado					
Virus	77/5 ¹	101/1 ¹	454/11 ¹	170/1 ²	423/6 ²
JS wt ³	800	6400	6400	25.600	25.600
rJS-NS ⁴	3200	25.600	6400	≤25	≤25

¹El mAb 77/5 reconoce el epítipo de anticuerpo IIB, los mAb 101/1 y 454/11 reconocen el epítipo de anticuerpo IIIA de la glicoproteína HN, ninguno de los cuales estaba alterado en el p218(131).

²Los mAb 170/7 y 423/6 que reconocían ambos el epítipo de anticuerpo I de JSwt, no reconocían el rJS debido a la mutación MARM en este sitio.

³HPIV3 JS de tipo silvestre derivado biológicamente.

Virus JS recombinante derivado de ADNc genómico de sentido negativo.

40 **[0128]** Para confirmar que el rPIV se recuperaba de hecho a partir de ADNc, se analizó en paralelo con HPIV3 de cepa JS de tipo silvestre mediante RT-PCR usando cuatro parejas de cebadores que flanquean las siete mutaciones marcadoras insertadas. Cada producto de PCR obtenido dependía de la inclusión de RT, indicando que cada uno procedía de ARN y no de ADNc contaminante. La secuenciación cíclica de los cuatro productos de PCR confirmó que la secuencia del rPIV contenía cada uno de los siete marcadores, y los datos de secuenciación que muestran tres de los marcadores se ilustran en la Figura 11. Las diferencias de secuencia entre rPIV y JS wt en el gen de HN, incluyendo los nucleótidos 7903, 7913 y 7915 eran fácilmente evidentes. Se llevaron a cabo análisis de secuencia similares para los otros cuatro marcadores en las posiciones de nucleótidos 7593, 10355, 11333 y 15248, y el rPIV poseía cada mutación.

50 **[0129]** Estos resultados demuestran una recuperación con éxito de rPIV infeccioso a partir de ADNc que codifica un ARN genómico de sentido negativo. Esto difiere de la mayoría de informes publicados para recuperación de virus de ARN de cadena negativa no segmentada, en los que el ADNc usado para la recuperación de virus se había diseñado para codificar ARN antígeno de sentido positivo (Baron y Barrett, anteriormente, 1997; Collins et al.,

anteriormente, 1995; Conzelmann, anteriormente, 1996; Garcin et al., anteriormente, 1995; Lawson et al., anteriormente, 1995; Radecke et al., anteriormente, 1995; Whelan et al., anteriormente, 1995). La recuperación de virus infeccioso a partir de un ADNc que codifica ARN genómico se había descrito previamente sólo en el caso del virus Sendai, y la eficacia de recuperación era mucho menor que para el ADNc que codifica ARN antigenómico (Kato et al., 1996). En la mayoría de otros estudios, la recuperación de virus se consiguió con ADNc antigenómico, pero no con ADNc genómico (Lawson et al., 1995; Whelan et al., 1995). Se han señalado varios problemas potenciales que pueden explicar estos resultados refractarios, incluyendo la posible hibridación de ARN genómico codificado por ADNc con ARNm producido por los plásmidos de soporte, dando como resultado híbridos inactivos (Conzelmann, anteriormente, 1996; Lawson et al., anteriormente, 1995). También se ha señalado que la ARN polimerasa de T7 parece terminar preferentemente en las uniones de genes del ARN genómico, quizá porque el tracto de oligo U de la señal GE se parece a la señal natural para la terminación de la transcripción por la ARN polimerasa de T7 (Whelan et al., anteriormente, 1995).

EJEMPLO VII

15 Recuperación de virus recombinante a partir de ADNc que codifica ARN antigenómico de sentido positivo

[0130] Como se ha descrito en más detalle anteriormente, se construyeron p3/7(131) y p3/7(131)2G para codificar un antigenoma de sentido positivo que dio origen a PIV recombinante. El plásmido p3/7(131)2G es idéntico al p3/7(131) excepto por la adición de dos restos G entre el promotor de T7 y el primer nucleótido del antigenoma. La adición de dos restos G entre el promotor de T7 y el primer nucleótido de HPIV3 del p3/7(131)2G se basa en los ejemplos anteriores, que demuestran que la presencia de los dos restos G añadidos (al contrario que 0, 1 ó 3 restos G añadidos) producía niveles sustancialmente aumentados de replicación de minirreplícón.

[0131] Los dos ADNc antigenoma [p3/7(131) y p3/7(131)2G] se transfectaron por separado en células junto con los plásmidos de soporte N, P y L y se infectaron simultáneamente con el virus recombinante MVA-T7 usando el mismo procedimiento descrito anteriormente para p218(131). Se recuperó virus infeccioso de cada ADNc antigenómico y se identificó presuntamente que procedía de ADNc por su incapacidad para reaccionar con los mAb 423/6 y 170/7.

[0132] La eficacia de la recuperación de virus se evaluó para cada uno de los ADNc de antigenoma frente al ADNc de genoma p218(131). Se realizaron doce reacciones de transfección usando el ADNc de genoma de sentido negativo p218(131) (SEC ID N°: 1) en paralelo con doce transfecciones usando el ADNc antigenoma de sentido positivo p3/7(131) 2G (SEC ID N°: 15) para comparar la eficacia de la recuperación de virus a partir de los dos ADNc. Se tituló un ml de la recolección de transfección de cada pocillo en células LLC-MK2 y los 2 ml restantes se pasaron (pase 1) sobre células LLC-MK2 recién preparadas. El día cinco, el pase 1 se recogió y se tituló como se ha descrito anteriormente. Se recuperó virus recombinante a partir de 12/12 pocillos transfectados con p3/7(131)2G, pero de sólo 4/12 pocillos transfectados con p218(131). El título medio de virus presente en cultivo del virus pasado a partir del antigenoma de sentido positivo era de $10^{5,0}$, casi diez veces superior al del genoma de sentido negativo, que era de $10^{4,1}$. Sin embargo, con una amplificación adicional, los títulos se volvieron equivalentes.

TABLA 2

Comparación de la eficacia de recuperación de virus recombinante a partir de ADNc que codifican ARN genómico o antigenómico, este último con o sin adiciones de restos 2G al promotor de T7

N° experimento	ADNc transfectado	Sentido de ARN codificado	Eficacia de rescate ¹	Título medio (log ₁₀ ufp/ml) de virus recuperado ²
N° 1	p3/7 (131) 2G ³	Antigenómico	12/12 (100%)	5,0 ± 0,27
	p218(131)	Genómico	4/12 (33%)	4,1 ± 0,27
N° 2	p3/7 (131) 2G ³	Antigenómico	6/6 (100%)	6,6 ± 0,18
	p3/7 (131)	Antigenómico	12/12 (100%)	5,3 ± 0,12
	p218 (131)	Genómico	5/5 (100%)	4,9 ± 0,19

¹ Número de cultivos de transfección que producían rJS/número ensayado.

² El título medio ± el error estándar se determinó después de un pase de la recolección de transfección durante cinco días en células LLC-MK2.

³ Contiene 2 restos G entre el promotor de T7 y el extremo 5' del antigenoma.

[0133] La eficacia de recuperación de virus recombinante a partir de los tres plásmidos de longitud completa que codifican los ARN de HPIV3 genómico o antigenómico se estudió a continuación, (i) para determinar si el ADNc genómico o antigenómico es más eficaz en la generación de virus recombinante y (ii) para determinar el efecto de dos restos G 5' terminales extra sobre la producción de virus recombinantes (Tabla 2). Desgraciadamente, no fue posible titular directamente la recolección de transfección por titulación de placas porque el MVA-T7 residual interfería con la formación de placas de rJS en cultivos en monocapa de LLC-MK2. Por lo tanto, se comparó primero la eficacia de recuperación de rJS a partir de múltiples transfecciones independientes y, como se observó en otros

- experimentos, se descubrió que el rJS se recuperaba más frecuentemente de cultivos transfectados con p3/7(131)2G que de cultivos transfectados con p218(131). Puesto que cada recolección de transfección, incluyendo las de p218(131), producían rJS en otros experimentos, no era posible usar este método de análisis para comparar la eficacia relativa de la generación de virus recombinante. Por lo tanto, se estimó la cantidad relativa de virus presente en la recolección de transfección cuantificando la cantidad de virus después de un pase de la recolección de transfección (Tabla 2). Puesto que cada plásmido estaba diseñado para producir un virus idéntico (rJS), las diferencias en títulos de los virus pasados se consideraron un reflejo de las diferencias en el título de virus presente en la recolección de transfección. En los experimentos anteriores, la construcción con dos restos G 5'-terminales era la más eficaz en la generación de rJS. Esto indicaba que los dos restos añadidos aumentaban de hecho la eficacia de recuperación, pero el mecanismo para este pequeño aumento en la eficacia no estaba definido. Estos descubrimientos indican una ventaja pequeña pero apreciable del uso de p3/7(131)2G como sustrato para futuros experimentos diseñados para introducir mutaciones en el ADNc de HPIV3. La pequeña ventaja en la recuperación de virus recombinante a partir de p3/7(131)2G podría ser especialmente necesaria para recuperar virus que tengan mutaciones atenuantes que restrinjan la replicación *in vitro*. Aunque se ha recuperado VSV a partir de ADNc antigenómico que incluía tres restos G en el extremo 5'-terminal, la eficacia de recuperación de virus a partir de esta construcción no se comparó con la recuperación a partir de la misma construcción que carecía de los restos extra (Whelan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392 (1995)). Al contrario que la experiencia con el virus Sendai y el virus del sarampión, está claro que los restos G extraviarales en el extremo 5'-terminal del antigenoma no son perjudiciales para la recuperación de virus recombinante y, de hecho, parecen ser ventajosos [Garcin et al., anteriormente, 1995; Radecke et al., anteriormente, 1995; Kato et al., 1996]. Los plásmidos genómico y antigenómico sin dos restos de guanina 5'-terminales parecían ser igualmente eficaces en la generación de virus recombinante. Esto es al contrario que informes previos que han encontrado que el ADNc genómico es menos eficaz que el ADNc antigenómico en la generación de virus recombinante (Whelan, 1995; Kato et al., 1996).
- [0134]** La eficacia de recuperación de virus a partir de p3/7(131) (SEC ID N°: 14) se comparó con la de p3/7(131)2G (SEC ID N°: 15) y p218(131) (SEC ID N°: 1) en un experimento similar al anterior. La recuperación a partir de p3/7(131) era comparable a la de p217(131). La recuperación era más uniforme y eficaz con ambos ADNc antigenoma que contienen las G extra (Tabla 2).

30 **EJEMPLO VII**

Eficacia de formación de placas de rPIV a temperaturas permisivas y restrictivas

- [0135]** El nivel de termosensibilidad de la replicación *in vitro* de virus de control y rPIV derivados tanto de p218(131) como de p3/7(131)2G se determinó a 32 °C, 37 °C, 39 °C y 40 °C en cultivos en monocapa de LLC-MK2 como se ha descrito anteriormente (Hall et al., Virus Res. 22: 173-184, (1992)), con las modificaciones siguientes. Los virus se inocularon sobre monocapas de LLC-MK2 en placas de 24 pocillos en diluciones seriadas de 10 veces que se dejó que se adsorbieran durante una hora a temperatura ambiente. Los cultivos se cubrieron después con 1 ml de L-15 complementado con glutamina 2 mM y metilcelulosa al 0,8% y las placas se incubaron después durante 5 días a la temperatura indicada. La capa de metilcelulosa se eliminó y la monocapa se fijó con metanol al 80% a 4 °C durante 1 h. Las placas virales presentes en la monocapa se puntuaron usando una mezcla de dos mAb murinos anti-HN específicos de HPIV3 101/1 y 66/4 como líquido ascítico usado a una dilución de 1:500, usando un método de tinción con inmunoperoxidasa específico para anticuerpos murinos, como se ha descrito anteriormente (Murphy et al., Vaccine 8: 497-502 (1990)).
- [0136]** Los virus recombinantes derivados de ADNc de sentido positivo o negativo se caracterizaron mediante ensayo de placas a 32 °C, 37 °C, 39 °C y 40 °C para determinar si eran fenotípicamente similares al virus JS wt. Los rPIV tanto de sentido positivo como de sentido negativo eran comparables con el virus JS wt a nivel de su replicación a temperaturas elevadas de 39 °C y 40 °C (Tabla 3). Esto es al contrario que el mutante *ts* JS *cp45*, que presenta una reducción de 30 veces en el título a 37 °C y deja de producir placas a 39 °C o 40 °C.

TABLA 3

El rJS se parece a su virus JS de tipo silvestre parental derivado biológicamente a nivel de replicación a una temperatura restrictiva (39 °C-40 °C)

Virus	Título de virus (log 10 ufp/ml)			
	32 °C	37 °C	39 °C	40 °C
rJS-PS ¹	6,1	6,1	6,1	6,6
rJS-NS ²	6,9	7,1	7,1	7,0
JS _{cp45} ³	6,3	4,3	<0,7	<0,7
JS wt	6,5	6,8	6,6	6,7

¹ Virus recombinante derivado del clon de sentido antigenómico p3/7(131)2G.

² Virus recombinante derivado del clon de sentido genómico p218(131).

³ JS_{cp45} es un mutante termosensible derivado de JS wt.

[0137] La secuencia de JS *cp45* se ha determinado completamente (Stokes et al., anteriormente, 1993) y se han identificado mutaciones en los genes de líder, N, P, M, F, HN y L. Sin embargo, se desconoce qué mutación o mutaciones son responsables de los fenotipos *ca*, *att* o *ts*. Debido a que el rPIV ejemplar de la invención demuestra el fenotipo *ts*¹ como el parental JS wt, pueden introducirse mutaciones de *cp45* entre otras mutaciones conocidas o todavía por descubrir para PIV, en solitario o en combinación, en el ADNc de longitud completa para precisar los efectos de mutaciones individuales o combinaciones de las mismas, por ejemplo, evaluando la replicación del virus recombinante que incorpora la mutación o mutaciones de interés a temperaturas elevadas. La mutación o mutaciones identificadas de este modo pueden incorporarse en agentes vacunales atenuados eficaces, como se describe en los Ejemplos a continuación. Éstas y otras mutaciones incorporadas en el PIV recombinante pueden optimizarse adicionalmente, por ejemplo, mediante mutagénesis, para crear dos o más sustituciones de nucleótidos por codón para hacer que un virus recombinante sea más genéticamente estable que una cepa mutante derivada biológicamente.

EJEMPLO VIII

Replicación de rPIV en hámsteres

[0138] Se dividieron treinta y seis hámsteres sirios dorados de 16 semanas de edad en cuatro grupos de nueve y se inocularon por vía intranasal con 0,1 ml que contenían 10^{5,5} ufp de rPIV recuperado a partir de ADNc de sentido negativo, rPIV recuperado a partir de ADNc de sentido positivo, virus JS *cp45* o JS wt. El día 4, los hámsteres se sacrificaron y se extirparon los pulmones y los cornetes nasales. Los pulmones se homogeneizaron en una suspensión de L-15 al 20% p/v que contenía anfotericina B 2,5 µg/ml (Quality Biologicals, Gaithersburg, MD), piperilina 200 µg/ml (Lederle Laboratories, Pearl River, NY) y gentamicina 50 µg/ml (Quality Biologicals). Los cornetes nasales se homogeneizaron de forma similar en una suspensión de L-15 al 10% p/v. Después de la homogeneización, las muestras se dividieron en alícuotas y se congelaron rápidamente en un baño de nieve carbónica-etanol. Los virus presentes en las muestras se titularon en una fecha posterior en placas de 96 pocillos de células LLC-MK2 a 32 °C puntuando el CPE a los cinco y siete días después de la inoculación. La media del log₁₀ de la DICT₅₀/g se calculó para cada grupo de nueve hámsteres.

[0139] La Tabla 4 ilustra que el rPIV recuperado a partir de ADNc de sentido negativo y el rPIV recuperado a partir de ADNc de sentido positivo se replican sustancialmente al mismo nivel que el JS wt en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres. Esto es al contrario que el virus JS *cp45*, que está atenuado en cada sitio.

TABLA 4

El rJS se parece a su virus JS wt parental derivado biológicamente a nivel de replicación en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres		
Título medio de virus (log ₁₀ DICT ₅₀ /g) ⁵		
Virus	Cornetes nasales	Pulmones
rJS-PS ¹	6,6 ± 0,2	4,1 ± 0,3
rJS-NS ²	6,4 ± 0,1	4,2 ± 0,2
JS <i>cp45</i> ³	4,2 ± 0,2	≤1,4 ± 0,0
JS wt ⁴	6,3 ± 0,2	4,6 ± 0,3

¹ Virus recombinante recuperado usando p3/7(131)2G que codifica el antigenoma de HPIV3 de sentido positivo.

² Virus recombinante recuperado usando p218(131) que codifica el genoma de HPIV3 de sentido negativo.

³ Mutante *ts* derivado biológicamente.

⁴ Virus parental derivado biológicamente.

⁵ Títulos medios ± errores estándar para nueve hámsteres por grupo.

[0140] Por lo tanto, los rPIV ejemplares de la invención pueden conservar la capacidad de replicación en hámsteres presentada por la cepa parental JS wt derivada biológicamente, por lo que mutaciones tales como las presentes en la vacuna candidata de JS *cp45* que restringen la replicación en hámsteres y otros hospedadores, incluyendo primates no humanos y seres humanos, pueden identificarse e incorporarse dentro las cepas de rPIV modificadas de la invención, como se describe en los Ejemplos a continuación.

EJEMPLO IX

Identificación de sustituciones de aminoácido en HPIV3 que especifican fenotipos atenuados e incorporación de mutaciones atenuantes en clones de PIV infecciosos atenuados

[0141] La capacidad para generar PIV infecciosos a partir de ADNc facilita el desarrollo de vacunas de virus parainfluenza vivo atenuado. Más específicamente, usando los métodos y herramientas descritos en la presente memoria puede determinarse fácilmente la base genética de la atenuación de vacunas candidatas de PIV y pueden diseñarse vacunas de PIV infeccioso producidas a partir de ADNc para conseguir un nivel finamente calibrado de

atenuación e inmunogenicidad.

[0142] Además, las herramientas y métodos de la invención proporcionan el desarrollo de vacunas para los tres virus parainfluenza humanos, HPIV1, HPIV2 y HPIV3, que son los más importantes en la enfermedad humana. Por ejemplo, para producir y seleccionar agentes vacunales de HPIV3 eficaces dentro de la invención, pueden identificarse mutaciones asociadas con fenotipos deseados de vacunas candidatas de HPIV3 derivadas biológicamente o del virus BPIV3 atenuado, por ejemplo, mutaciones atenuantes, e incorporarse en rPIV. Aplicando estos métodos, se seleccionan mutaciones atenuantes de un gran menú de mutaciones candidatas y se combinan para generar rPIV que tengan un equilibrio deseado entre atenuación e inmunogenicidad, y que conserven el fenotipo de atenuación después de la replicación en seres humanos.

[0143] En el presente ejemplo, se describen las bases genéticas de los fenotipos termosensible (*ts*) y de atenuación *in vivo* (*att*) del virus vivo atenuado PIV3 JS *cp45*. Se recuperaron siete virus PIV3 recombinantes ejemplares (tres virus con una sola lesión, tres virus con una lesión doble y un virus con lesión triple) a partir de ADNc antigenómico de longitud completa y se analizaron para determinar sus fenotipos *ts* y *att*. Estos recombinantes llevaban una o más mutaciones por sustitución de aminoácido presentes en el gen de L de JS *cp45* (como alternativa denominado en la presente memoria *cp45*) adoptadas dentro de un clon de ADNc del parental JS wt. Estas tres mutaciones derivadas biológicamente ejemplares están todas presentes en una cepa representativa de JS *cp45* cultivada en células Vero, denominada JS *cp45* Vero, depositada el 21 de agosto de 1997 bajo los términos del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos, y a la que se le concedió el número de acceso ATCC VR 2588.

[0144] Los análisis de recombinantes de PIV ejemplares presentados a continuación demuestran que cada una de las tres mutaciones ejemplares en L (Tyr₉₄₂ a His, Leu₉₉₂ a Phe y Thr₁₅₅₈ a Ile) contribuyen a los fenotipos *ts* y *att* de *cp45* y son útiles para la generación de virus vacunal recombinante.

Virus y células

[0145] Los virus PIV3 JS wt y *cp45* se cultivaron en células LLC-MK2 como se ha descrito previamente (Hall et al., Virus Res. 22:173-184 (1992)). El virus vaccinia recombinante vTF7-3 se describe en Fuerst et al., Virology 225: 419-422 (1996) y el virus vaccinia modificado Ankara (MVA), que expresa la polimerasa de T7, se describe en Wyatt et al., Virology 210: 202-205 (1995).

[0146] Se mantuvieron células HEp-2 (ATCC CCL 23) y LLC-MK2 (ATCC CCL 7.1) en OptiMEM (Life Technologies) complementado con FBS al 2% y sulfato de gentamicina (50 µg/ml).

Construcción de mutaciones puntuales en el gen de L de PIV3

[0147] Se modificó el pUC19 para aceptar un fragmento del gen de L de PIV3 JS wt para introducir mutaciones puntuales en el gen de L mediante mutagénesis dirigida. En primer lugar, se introdujo un sitio de restricción *Nhe* I único en el pUC19 por ligación de una pareja de oligonucleótidos complementarios (5' GATCGATGCTAGCCC 3' (SEC ID N°: 23) y 5' GATCGGGCTAGCATC 3' (SEC ID N°: 24)) que contenían un sitio de restricción *Nhe* I en el sitio *Hind* III de pUC19 para crear el pUC19 (N). El fragmento de *Sph* I (nucleótido 11317 de PIV3) a *Nhe* I (nucleótido 14087 de PIV3) de pTM(L), que incluye las posiciones en las que aparecen los tres cambios codificantes en *cp45* y que pueden introducirse directamente en el ADNc de PIV3 de longitud completa (véase a continuación), se clonó en el sitio *Sph* I y *Nhe* I de pUC19 (N) para crear el pUCL(N-S). Se introdujeron mutaciones puntuales en el pUCL(N-S) usando oligonucleótidos mutagénicos con el kit de mutagénesis Transformer (Clontech, Palo Alto, CA) con el fin de (i) crear sustituciones de aminoácidos ejemplares en las posiciones de la proteína L 942, 992 y 1558, individualmente y en combinación, y (ii) suprimir un sitio de enzima de restricción de origen natural específico próximo a cada sustitución de codón como marcador [Véase la Tabla 5].

TABLA 5: Sustituciones de nucleótidos introducidas en rPIV3 que codifican sustituciones de aminoácidos del gen de la proteína L de *cp45* y, como marcadores, suprimir sitios de enzimas de restricción de origen natural.

Denominación de rPIV3	Sustitución de aminoácido (de wt a <i>cp45</i>)	Secuencia de wt ^a	Secuencia de mutante	Sitio de enzima de restricción suprimido
r942	Tyr-942 a His	11468- TTACA TGGCCAT (SEC ID N°: 25)	11468-T CAC ATGGCGAT (SEC ID N°: 26)	<i>Eae</i> I
r992	Leu-992 a Phe	11618- TTT IGATTGGGC (SEC ID N°: 27)	11618- TTT IGATTGGGC (SEC ID N°: 28)	<i>Bsr</i> I
r1558	Thr-1558 a Ile	13307- TGG T CCTAATA CTG (SEC ID N°: 29)	13307- TGG G CCTAATA TCG (SEC ID N°: 30)	<i>Ava</i> II

a. Se muestra la secuencia de nucleótidos alrededor de cada una de las tres regiones mutadas. El primer nucleótido en cada secuencia proporcionada está numerado de acuerdo con su posición en el ARN antigenómico completo. El codón implicado en cada sustitución de aminoácido está en negrita. Los sitios de enzimas de restricción de origen natural presentes en la secuencia wt y que se suprimieron para marcar la mutación están en cursiva. Los nucleótidos que se mutaron para producir una sustitución de aminoácido o eliminar un sitio de enzima de restricción están subrayados.

Las mutaciones introducidas en derivados de pUCL(N-S) se verificaron por secuenciación con didesoxinucleótidos de ADN plasmídico. El fragmento de *Sph* I a *Bam*HI (nucleótido 13733) de pUCL(N-S), que contenía las mutaciones del gen de L individuales de *cp45*, se subclonó en los sitios *Sph* I a *Bam*HI de pTM(L) para dar el pTM(L)-942, -992, -942/992 y -1558; las otras dobles y triples mutaciones se ensamblaron usando los sitios *Pin* AI y *Nhe* I (Fig. 12). Los plásmidos pTM(L) mutantes se ensayaron cada uno a una temperatura permisiva (32 °C) para determinar la capacidad para dirigir la expresión del gen marcador de cloranfenicol acetil transferasa en un sistema de minirreplicón que comprende un ARN de minigenoma codificado por plásmido y las proteínas N, P y L (Durbin et al., Virology 234: 74-78 (1997)). Los diversos plásmidos de L mutantes servían de soporte a la expresión de gen marcador hasta el 75-106% del nivel de L wt, indicando que cada ADNc modificado por ingeniería genética estaba libre de falsas mutaciones importantes (no se muestra). Los fragmentos de *Sph* I a *Nhe* I de cada uno de los plásmidos pTM(L) mutantes se subclonaron después en la ventana de *Sph* I a *Nhe* I del ADNc antigenómico de PIV3 JS de longitud completa p3/7(131)2G para crear siete clones de ADNc de PIV3 de longitud completa que representan cada combinación posible de las tres sustituciones.

15 **Recuperación de PIV3 recombinante (rPIV3) que lleva una, dos o tres sustituciones de proteína L de *cp45***

[0148] Cada ADNc antigenómico de longitud completa que lleva una o más mutaciones de gen de L de *cp45*, junto con los tres plásmidos de soporte pTM(N), pTM(P) y pTM(L), se transfectó en células HEp-2 en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) usando LipofectACE (Life Technologies) y MVA-T7 como se ha descrito anteriormente. Después de la incubación a 32 °C durante 4 días, la recolección de transfección se pasó sobre células HEp-2 en placas de 6 pocillos que se incubaron a 32 °C durante 4 días. Cada sobrenadante de pase 1 se recogió y se pasó sobre un matraz T-25 de células LLC-MK2 que se incubó a 32 °C durante 5-6 días. El sobrenadante del pase 2 se recogió y la presencia de virus recombinante se confirmó inicialmente por tinción con inmunoperoxidasa de placas de virus (Murphy et al., Vaccine 8: 497-502 (1990)), con anticuerpo monoclonal anti-HN (Mab) 77/5, que se une a PIV3 JS tanto recombinante como derivado biológicamente, y Mab 423/6, que no se une a virus derivado de ADNc porque su epítipo se suprimía para servir como marcador. El virus presente en el pase 1 se sometió a dos o tres rondas de purificación de placas en células LLC-MK2 como se ha descrito anteriormente. Cada virus recombinante biológicamente clonado se amplificó dos veces en células LLC-MK2 a 32 °C para producir virus para una caracterización adicional. El virus se concentró a partir de medio aclarado mediante precipitación con polietilenglicol y se extrajo el ARN viral (ARNv) con Reactivo Trizol (Life Technologies). Se realizó la transcripción inversa (RT) sobre ARNv usando el kit Superscript II con cebadores hexaméricos aleatorios (Life Technologies). Se usó el kit de PCR de ADNc Advantage (Clontech, Palo Alto, CA) y cebadores con sentido (5' nt 11190-GCATTATCTAGATGTGTCTTCTGGTCAGAG 3' nt-11219) (SEC ID N°: 31) y antisentido (5' nt 14140-CCTGAATTATAATAATTAAGTGCAGGTCCT 3' nt-14111) (SEC ID N°: 32) específicos para el gen de L de PIV3 para amplificar la región que abarcaba el fragmento de *Sph* I a *Nhe* I. Los fragmentos de PCR se analizaron por digestión con cada una de las enzimas de restricción cuyos sitios de reconocimiento se habían suprimido durante la inserción de las tres mutaciones de *cp45* en L (véase la Tabla 5).

40 **Eficacia de formación de placas (EOP) a temperaturas permisiva y restrictiva de rPIV3 que una, dos o tres sustituciones de aminoácido de proteína L de *cp45***

[0149] El nivel de termosensibilidad de la formación de placas *in vitro* de virus de control y recombinantes se determinó a 32 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C y 41 °C en cultivos en monocapa de LLC-MK2 y las placas se enumeraron por hemadsorción con eritrocitos de cobaya después de la eliminación de la capa de metilcelulosa. Como alternativa, las placas virales presentes en la monocapa se identificaron mediante tinción con inmunoperoxidasa con una mezcla de dos mAb murinos anti-HN específicos de PIV3 101/1 y 454/11 diluidos 1:500 (Murphy et al., anteriormente, (1990)).

50 **Estudios en hámster**

[0150] Se inocularon hámsteres sirios dorados de 4 a 16 semanas de edad en grupos de seis por vía intranasal con 0,1 ml de OptiMEM1 por animal que contenía 10^{5.5} ufp de rPIV3 JS wt, virus PIV3 *cp45* o uno de los rPIV3 que contienen una o más sustituciones de proteína L de *cp45*. El día 4 post-infección, los hámsteres se sacrificaron, se extirparon los pulmones y los cornetes nasales y los virus se cuantificaron como se ha descrito anteriormente. Se calculó la media del log₁₀ de la DICT₅₀/g para cada grupo de seis hámsteres.

RESULTADOS

Introducción de las sustituciones de aminoácidos de proteína L de PIV3 cp45 en rPIV3 JS wt

5 **[0151]** Como se ha señalado anteriormente, las tres sustituciones de aminoácidos presentes en la proteína L de cp45 (Tabla 5) se introdujeron individualmente o en combinaciones seleccionadas en el ADNc antigenómico que codifica su cepa de PIV3 JS wt parental. Cada mutación introducida se modificó por ingeniería genética para marcarse con una mutación silenciosa que suprimía un sitio de enzima de restricción de origen natural proximal para facilitar el control de la mutación en el rPIV3 recuperado (Tabla 5, Fig. 12). El cambio de codificación en el aminoácido 1558 estaba diseñado para contener dos cambios de nucleótidos en r1558, en comparación con una sustitución de nucleótido en cp45 para reducir las posibilidades de reversión en este sitio durante la replicación *in vitro* o *in vivo*.

15 **[0152]** Se recuperaron siete rPIV3 que llevaban una, dos o las tres sustituciones de aminoácidos de cp45 en cultivo tisular por transfección de cada ADNc antigenómico junto con los plásmidos de soporte pTM(N), pTM(P) y pTM(L) y coinfección con el virus vaccinia MVA/T7 pol recombinante (Wyatt et al., anteriormente, (1995)). Cada rPIV3 poseía el marcador de resistencia a Mab que se había introducido deliberadamente en el gen de HN por ingeniería genética del ADNc antigenómico. Los rPIV3 se clonaron biológicamente mediante dos o tres ciclos de pase de placa a placa para asegurarse de que cada preparación de virus fuera genéticamente homogénea. Esta precaución se tomó porque el virus vaccinia puede mediar la recombinación entre el ADNc antigenómico y los plásmidos de soporte.

25 **[0153]** Para confirmar que cada uno de los siete rPIV3 contenía la mutación o mutaciones introducidas por ingeniería genética en el gen de L, se purificó el ARN a partir de viriones precipitados y se copió a ADNc y se amplificó mediante RT-PCR. Las reacciones de control demostraron que la etapa de RT era necesaria para la generación de productos de RT-PCR, indicando que era necesario un molde de ARN más que ADNc contaminante para la generación del producto de RT-PCR. Los productos de RT-PCR se sometieron a digestión con las tres enzimas de restricción cuyas secuencias de reconocimiento se habían suprimido como marcadores para los cambios de codificación insertados. Como se esperaba, el producto de RT-PCR de rPIV3 JS wt se escindió el número de veces apropiado por cada una de las tres enzimas, mientras que el r942/992/1558 carecía de cada uno de los tres sitios suprimidos durante la creación de los cambios de codificación de cp45 individuales. Cada uno de los otros rPIV3 carecía del sitio o sitios de restricción apropiados, indicando la presencia de las mutaciones introducidas.

35 Eficacia de formación de placas a 32 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C y 41 °C de rPIV3 que lleva mutaciones de L de cp45

[0154] Los siete rPIV3 que llevan las diversas combinaciones de sustituciones de aminoácidos de proteína L de cp45 se ensayaron para determinar su capacidad para formar placas en monocapas de LLC-MK2 a 32 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C y 41 °C. Como se muestra en la Tabla 6, cada rPIV3 que lleva una sustitución de aminoácido de cp45 era *ts*, mientras que el rPIV3 JS wt parental no veía restringida su formación de placas a ninguna temperatura ensayada. La temperatura de interrupción de la formación de placas de r942, r992 y r1558 era de 40 °C. El r492 manifestó una reducción de 700 veces de la formación de placas a 40 °C, indicando que su replicación se veía ligeramente reducida a esta temperatura restrictiva. Sin embargo, el tamaño de placas del r942 también se reducía enormemente a 40 °C, lo que también indica que su replicación estaba restringida a esta temperatura en comparación con el JS wt. El r942 se veía completamente restringido en la replicación a 41 °C (no se muestran los datos). El r992 y el r1558 reducían enormemente (una reducción de más de 1.000.000 de veces) la formación de placas a 40 °C. Estos resultados indican que cada una de las tres mutaciones del gen de L de cp45 especifica individualmente el fenotipo *ts*, aunque la de la mutación r942 es algo menos restrictiva. Los virus dobles mutantes r942/1558 y el triple mutante r92/992/1558 tenían una temperatura de interrupción de 39 °C, mientras que la de r942/992 y cp45 era de 38 °C. El doble mutante, r992/1558 era menos *ts* que el mutante individual r992. El r992/1558, como el r942, veía completamente restringida su formación de placas a 41 °C. El nivel de termosensibilidad presentado por los dobles o triples mutantes es el resultado de una interacción delicada de rPIV de las tres mutaciones que no puede predecirse a partir del nivel de termosensibilidad presentado por los mutantes individuales. Además, puesto que el r942/992/1558 era ligeramente menos *ts* que el cp45, también es probable que otras mutaciones fuera del gen de L contribuyan al fenotipo *ts* de cp45, representando por lo tanto mutaciones adicionales de interés dentro de la invención.

Tabla 6: La eficacia de formación de placas (EOP) a 32 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C y 40 °C de rPIV3 que lleva uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos de proteína L de *cp45*

Virus ^a	Título de virus (log ₁₀ ufp/ml)				
	32 °C	37 °C	38 °C	39 °C	40 °C
r942	6,8	6,8 ^b	6,6 ^b	6,5 ^b	4,3 ^b
r992	6,9	6,8 ^b	6,7 ^b	6,1 ^b	<0,7
r1558	6,6 ^b	6,6 ^b	6,4 ^b	5,0 ^b	<0,7
r942/992	6,7	6,5 ^b	4,5 ^b	3,0 ^b	<0,7
r942/1558	5,2	5,0 ^b	4,0 ^b	1,0 ^b	<0,7
r992/1558	6,7	6,7 ^b	6,5 ^b	5,9 ^a	5,1b
r942/992/1558	6,6	6,2 ^b	6,2 ^b	2,7b	<0,7
<i>cp45</i> ^b	6,6	4,8	4,5 ^b	<0,7	<0,7
rPIV3 JS	8,3	8,4	8,5	8,5	8,3

a. El virus *cp45* es un virus derivado biológicamente y cada uno de los otros virus ensayados es un recombinante.

b. Las placas eran del tamaño de puntas de alfiler.

c. Los números subrayados representan la temperatura de interrupción de la formación de placas, que se define como la temperatura restrictiva más baja a la que se observa una reducción de 100 veces en el título en comparación con el título a 32 °C.

[0155] Crecimiento en hámsteres. Se inocularon grupos de seis hámsteres sirios dorados por vía intranasal con rPIV3 JS wt, *cp45* derivado biológicamente o con rPIV3 que contiene una o más sustituciones de aminoácidos de proteína L de *cp45*, y se determinó la replicación de virus en los pulmones y en los cornetes nasales. En este experimento [Tabla 7] se restringió la replicación de cada uno de los rPIV3 que llevaba una sustitución de un solo aminoácido en el tracto respiratorio superior e inferior [Tabla 7]. Sin embargo, el r942, el virus menos *ts*, se suprimía sólo marginalmente en replicación en el tracto respiratorio superior e inferior en un segundo experimento. Estos datos demuestran que dos de las tres sustituciones de aminoácidos contribuyen al fenotipo *att* cuando están presentes como virus recombinantes con una sola lesión. Sin embargo, la mutación 942 contribuye de hecho a la atenuación (por ejemplo, el r942/992 está más atenuado que el r992 solamente). Por lo tanto, cada una de las sustituciones de aminoácidos en L contribuye al fenotipo *att* actuando en solitario o de acuerdo con otra mutación de aminoácido de L. Cada uno de los dobles mutantes estaba atenuado, indicando que la pérdida de cualquiera de las tres sustituciones de gen L después de la replicación *in vivo* deja todavía un virus atenuado. Esta es una explicación parcial del alto nivel de estabilidad observado previamente del fenotipo *ts* del *cp45* después de la replicación *in vivo*. El triple mutante r942/992/1558 estaba tan restringido como *cp45* para la replicación en el tracto respiratorio superior e inferior, indicando que las tres sustituciones de aminoácidos en la proteína L eran los que contribuían fundamentalmente al fenotipo *att* de *cp45*.

Tabla 7: El nivel de replicación en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres de rPIV3 que lleva uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos de proteína L de *cp45* en comparación con rPIV3 JS wt y *cp45*^a.

Virus	Título medio de virus (log ₁₀ DITC ₅₀ /g ± E.E. ^b)	
	Cornetes nasales	Pulmones
rPIV3 wt	7,4 ± 0,16	5,1 ± 0,49
r942	6,6 ± 0,17	3,0 ± 0,78
r992	4,4 ± 0,16	3,1 ± 0,11
r1558	3,8 ± 0,40	4,3 ± 0,34
r942/992	<1,5 ± 0	<1,5 ± 0
r942/1558	2,9 ± 0,23	1,8 ± 0,17
r992/1558	5,7 ± 0,16	3,2 ± 0,57
r942/992/1558	3,9 ± 0,15	<1,5 ± 0
<i>cp45</i>	4,1 ± 0,27	1,6 ± 0,08

a. A grupos de seis hámsteres cada uno se les administró por vía intranasal 10^{5,5} ufp de virus por animal en un inóculo de 0,1 ml y se extirparon los pulmones y los cornetes nasales cuatro días después.

b. Error estándar.

c. *cp45* es un virus derivado biológicamente y los otros son recombinantes.

[0156] Para resumir los resultados anteriores, las sustituciones en las posiciones de aminoácidos de proteína L 992 y 1558 especificaban cada una una reducción de 1.000.000 de veces en la formación de placas en cultivo celular a 40 °C, mientras que la sustitución en la posición 942 especificaba una reducción de 700 veces. Por lo tanto, cada una de las tres mutaciones contribuye individualmente al fenotipo *ts*. El triple recombinante que posee las tres mutaciones L es ligeramente menos *ts* que *cp45*, sugiriendo que hay mutaciones fuera del gen de L en *cp45* que también podrían contribuir a su fenotipo *ts*. Dos de las tres mutaciones individuales en L contribuían cada una a la replicación restringida en el tracto respiratorio superior o inferior de hámsteres, lo que explica la estabilidad observada de los fenotipos *ts* y *att* de *cp45* durante la replicación *in vivo*. De forma importante, el nivel de

- termosensibilidad de cepas vacunales recombinantes *in vitro* era muy predictivo de la atenuación *in vivo*. El virus recombinante que poseía las tres mutaciones estaba tan restringido en la replicación como el mutante *cp45* en el tracto respiratorio tanto superior como inferior de los hámsteres, indicando que el gen de L del virus *cp45* es un componente atenuante principal de esta cepa vacunal candidata. Aunque cada mutación por sí misma especifica el fenotipo *ts*, cuando se ponen juntas no son solamente aditivas, sino que en su lugar influyen de algún modo entre sí. El efecto de las tres mutaciones juntas en el triple mutante parecía aliviar más que aumentar el nivel de termosensibilidad observado en los dos dobles mutantes que se evaluaron. Curiosamente, esto debería proporcionar una presión selectiva inesperada para mantener al menos algunas de las mutaciones de L de *cp45*, puesto que la pérdida por reversión de la sustitución 992 o 1558 aumentaría más que disminuir el nivel de termosensibilidad.
- Considerados en su conjunto, estos descubrimientos indican que el alto nivel de estabilidad de los fenotipos *ts* y *att* de virus *cp45* es el resultado de la contribución de múltiples mutaciones *ts* en L al fenotipo *att*. La identificación de estas tres mutaciones como las mutaciones atenuantes principales de *cp45* proporciona la base para controlar los virus durante todas las fases de fabricación y después de la replicación en seres humanos.
- [0157] Es de interés adicional que la mutación de tirosina a histidina en la posición 942, que se podría mantener que es la sustitución más conservativa de las tres mutaciones, era la menos termosensible. La polimerasa L de PIV3 es un polipéptido grande, de 2233 aminoácidos de longitud, y se cree que es una proteína multifuncional que codifica múltiples dominios incluyendo los necesarios para la formación de un complejo con la proteína P, unión a ARN, poliadenilación del ARN, transcripción del ARN y replicación del ARN (Collins et al., anteriormente, (1996)).
- Las sustituciones de aminoácidos en L en las posiciones 942 y 992 se localizan próximas a regiones que están bien conservadas entre otros miembros de la familia de Paramyxovirus (Blumberg et al., Virology 164: 487-497 (1982); Galinski et al., Virology 165: 499-510 (1988)). La mutación en la posición 1558 está en una región de la polimerasa que parece compartir menos identidad de secuencia con otras polimerasas L. Aunque no se conoce el mecanismo por el que se confiere el fenotipo *ts* mediante la triple sustitución de aminoácido en L, es probable que estén afectados múltiples dominios y actividades de la proteína L, o que esté afectado un mecanismo común que implique diversas actividades de L.

EJEMPLO X

- [0158] **Identificación directa y reconstitución en virus vacunal recombinante de mutaciones en un virus HPIV tipo 3 vivo atenuado derivado biológicamente (cp45) que especifica los fenotipos de termosensibilidad, adaptación al frío y atenuación**

- Los Ejemplos anteriores demuestran que cada una de las tres sustituciones de aminoácidos en la proteína polimerasa L de *cp45* confiere los fenotipos de termosensibilidad (*ts*) y atenuación (*att*), pero no el fenotipo de adaptación al frío (*ca*) (véase también, Skiadopoulos et al., J. Virol 72 (3): 1762-8, 1998). El *cp45* contiene doce mutaciones adicionales en otras proteínas (N, C, M, F y HN) o secuencias de acción en cis potenciales (la región líder y la señal transcripcional del inicio del gen {GS} del gen de N) y su contribución a estos fenotipos no se ha definido hasta ahora. El presente Ejemplo caracteriza adicionalmente la base genética para los fenotipos *ts*, *ca* y *att* de *cp45*, para proporcionar todavía más información respecto a la base para el alto nivel de estabilidad observado de estos fenotipos después de la replicación de *cp45* en seres humanos o primates no humanos. En un aspecto de este estudio, se construyó un virus *cp45* recombinante (*rcp45*) que contenía las quince mutaciones específicas de *cp45* usando un sistema genético inverso, y se descubrió que era esencialmente indistinguible del virus derivado biológicamente en base al tamaño de placa, al nivel de termosensibilidad, a la adaptación al frío y al nivel de replicación en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres. Además, se construyeron virus recombinantes que contenían: (1) los cambios específicos de *cp45* en las proteínas C, M, F o HN, (2) las mutaciones de líder y gen de N combinadas o (3) varias combinaciones de las mutaciones de *cp45*. El análisis de estos virus recombinantes demostró que múltiples mutaciones de *cp45* distribuidas por todo el genoma contribuían a los fenotipos *ts*, *ca* y *att*. Las mutaciones en C y F no eran *ts* a 40 °C, pero no obstante conferían el fenotipo *att* y, por lo tanto, son mutaciones *att* no *ts*. La mutación de HN no confería los fenotipos *ca*, *ts* o *att*. Los virus que poseían las mutaciones de N y líder 3' eran *ts*, pero presentaban una atenuación sólo ligera en el tracto respiratorio inferior de hámsteres. Los recombinantes que poseían varias combinaciones de mutaciones presentaban un nivel superior de termosensibilidad que *cp45*, pero el nivel aumentado de termosensibilidad no se reflejaba en un aumento en la atenuación *in vivo*. Estos últimos descubrimientos indican que las múltiples mutaciones identificadas en *cp45* están interaccionando para afectar a la replicación *in vitro*. La presencia de múltiples mutaciones atenuantes *ts* y no *ts* en *cp45* contribuye probablemente a su alto nivel de atenuación y a su estabilidad fenotípica. El conocimiento de los fenotipos asociados con las diversas mutaciones de *cp45* proporcionadas en la presente memoria permite un control preciso de virus PIV derivados biológicamente y una fácil manipulación de virus recombinantes para conseguir una colección grande de recombinantes vacunales útiles dentro de la invención.

Virus y células

- [0159] Los virus rPIV3, PIV3 JS wt y *cp45* descritos en el presente Ejemplo se cultivaron en células LLC-MK2 de

simio (ATCC CCL 7.1), como se ha descrito anteriormente (véase también, Durbin et al., Virology 235: 323-332, 1997a; Hall et al., Virus Res. 22(3): 173-184, 1992; Skiadopoulos et al., J. Virol 72 (3): 1762-8, 1998). Se proporcionó el virus vaccinia modificado Ankara como se ha descrito anteriormente. Las células HEP-2 (ATCC CCL 23) y LLC-MK2 se mantuvieron en OptiMEM I (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con FBS al 2% y sulfato de gentamicina (50 µg/ml), o en EMEM complementado con FBS al 10%, sulfato de gentamicina (50 µg/ml) y glutamina 2 mM. Se cultivaron células L-132 (ATCC CCL 5) en MEM de Earl (Life Technologies) complementado con FBS al 10%, glutamina 2 mM, Hepes 20 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM y 100 unidades de estreptomicina-neomicina/ml.

10 Construcción de mutaciones puntuales en PIV3

[0160] Los fragmentos subgenómicos de p3/7(131)2G, el clon de ADNc antigenómico de PIV3 JS wt usado anteriormente para recuperar virus infeccioso (véase también, Durbin et al., Virology 235: 323-332, 1997a; Skiadopoulos et al., J. Virol. 72 (3): 1762-8, 1998), se clonaron en vectores pUC19 modificados para aceptar estos fragmentos, usando técnicas de clonación molecular convencionales. Las mutaciones puntuales correspondientes a mutaciones identificadas en *cp45*, así como mutaciones que crean o suprimen secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción silenciosas (Tabla 8), se introdujeron usando el kit de mutagénesis Transformer (Clontech, Palo Alto, CA), como se ha descrito anteriormente.

20 **Tabla 8: Mutaciones de PIV3 *cp45* introducidas en rPIV3**

	sec. id nº	región afectada	posición nt ^a	cambios de secuencia ^b	marcador de restricción ^c	sustitución de aminoácido ^d
1	46 47	líder 3'	20	TTGTCTGGGAAT TTGCCTGGGAAT	ninguno	no codificante
2	46 48	líder 3'	20	TTGTCTGGGAAT TTGTTTGGGAAT	ninguno	no codificante
3	46 49	líder 3'	20	TTGTCTGGGAAT TTGTCTGGTAAT	ninguno	no codificante
4 ^e	50 51	líder 3'	40	AAC TTT AAATTA AACTTAA AA TTA	- <i>Dra</i> I	no codificante
5 ^e	52 53	gen N	60 inicio	TTAAAGACATTG TTTAAGACATTG	ninguno	no codificante
6 ^e	54 55	N	390	GCAGAT GT CAAG GCAGAT G CCAAG	ninguno	Val-96 a Ala
7 ^e	56 57	N	1271	CGAATCTAAAGA CGAAG G CTAAAGA	ninguno	Ser-389 a Ala
8	58 59	C	2076	GAA AT ATTGATC GAA A CATTGATC	- <i>Ssp</i> I	Ile-96 a Thr
9	60 61	M	4341	TCTCTACCCAAC TC G TTA A CCAAC	+ <i>Hpa</i> I	Pro-199 a Thr
10 ^f	62 63	F	6323	AGTACA A TAGGT AGTACT GT GGGT	+ <i>Sca</i> I	Ile-420 a Val
11	64 65	F	6419	G CACTTGATCCA A CACT G GATCCA	+ <i>Bam</i> HI	Ala-450 a Thr
12	66 67	HN	7944	CCATCATTGTT G TTGACAA CCATCATTG TG GCTGACAA	+ <i>Bst</i> XI	Val-384 a Ala
13	68 69	L	11468	TTACA T GGCCA T CACATGGCCA	- <i>Eae</i> I	Tyr-942 a His
14	70 71	L	11618	TTT GGA C TGGGC TTT TGATTGGGC	- <i>Bsr</i> I	Leu-992 a Phe
15 ^f	72 73	L	13308	GGT C CTA A CT GG G CCTA A T A T C	- <i>Ava</i> II	Thr-1558 a Ile

a. Posición del primer nucleótido en la secuencia de PIV3 mostraba. b. La secuencia de tipo silvestre se muestra encima de la secuencia mutante. Los cambios de nucleótidos están subrayados. Las sustituciones de codones están en negrita. c. Cada secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción relevante está en cursiva; (+) indica la adición de una nueva secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción; (-) indica la supresión de una secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción de origen natural. d. Las mutaciones se indican como la asignación de aminoácido de tres letras del wt, seguida por la posición del aminoácido, seguida por la asignación del *cp45*. e. Estas mutaciones se identificaron por Joanne Tatem (observaciones sin publicar), las otras eran de Stokes et al., Virus Res. 30 (1) : 43-52, 1993. f. Se cambiaron dos nucleótidos en el codón indicado para reducir las posibilidades de reversión a la secuencia de tipo silvestre.

[0161] Después de la mutagénesis, los fragmentos de endonucleasas de restricción se secuenciaron

completamente y se volvieron a clonar en el clon de longitud completa, p37(131)2G. Las mutaciones de N y líder 3' se amplificaron por transcripción inversa (RT)-PCR directamente a partir de ARN de virión de PIV3 *cp45* y se clonaron en el pLeft+2G (véase anteriormente), o en un vector pUC19 modificado, para una manipulación adicional. Se construyeron combinaciones de mutaciones usando técnicas de clonación molecular convencionales. El clon de plásmido de longitud completa que contenía las mutaciones de *cp45*, denominado pFLC*cp45*, se secuenció completamente para determinar si se habían introducido mutaciones extrañas durante el procedimiento de clonación, pero no se encontraron.

Recuperación de PIV3 recombinante (rPIV3)

10

[0162] Cada ADNc antigenómico de longitud completa que lleva mutaciones de *cp45* junto con los tres plásmidos de soporte pTM(N), pTM(P no C) y pTM(L) se transfectó en células HEp-2 en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) usando LipofectACE (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y MVA-T7, como se ha descrito anteriormente. Después de la incubación a 32 °C durante 4 días, la recolección de transfección se pasó sobre células LLC-MK2 en matraces T-25 que se incubaron a 32 °C durante de cuatro a ocho días. Este virus recogido se denominó pase 1 y se sometió a tres rondas de purificación de placas en células LLC-MK2 como se ha descrito anteriormente. Cada virus recombinante biológicamente clonado se amplificó dos veces en células LLC-MK2 a 32 °C para producir virus para una caracterización adicional. El virus se concentró a partir de medio aclarado mediante precipitación con polietilenglicol (véase Mbiguino y Menezes, J. Virol Methods 31: 2-3, 1991,) y se extrajo el ARN viral (ARNv) con reactivo Trizol (Life Technologies). Se realizó la transcripción inversa en ARNv usando el sistema de preamplificación Superscript II (Life Technologies) con cebadores hexaméricos aleatorios. Se usó el kit de PCR de ADNc Advantage (Clontech) y cebadores con sentido y antisentido específicos para diversas porciones del genoma de PIV3 para amplificar fragmentos para análisis de endonucleasas de restricción. Los fragmentos de PCR se analizaron por digestión con cada una de las enzimas de restricción cuyos sitios de reconocimiento se habían creado o suprimido durante la construcción de las mutaciones (Tabla 8).

Eficacia de formación de placas (EOP) de rPIV3 que lleva mutaciones de *cp45* a temperaturas permisivas y restrictivas

[0163] Se determinó el nivel de termosensibilidad de la formación de placas *in vitro* de virus de control y recombinantes a 32 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C y 41 °C en cultivos en monocapa de LLC-MK2, como se ha descrito anteriormente (véase también, Hall et al., Virus Res. 22 (3) : 173-184, 1992). Las placas se enumeraron por hemadsorción con eritrocitos de cobaya después de la eliminación de la capa de metilcelulosa, o como alternativa, las placas virales presentes en la monocapa se identificaron mediante tinción con inmunoperoxidasa con una mezcla de dos mAb murinos anti-HN específicos de PIV3 101/1 y 454/11 diluidos 1:250 (véase, Murphy et al., Vaccine 8 (5): 497-502, 1990; van Wyke Coelingh et al., Virology 143 (2): 569-582, 1985).

Evaluación de virus mutantes rPIV3 para el fenotipo de adaptación al frío

[0164] Se determinó el crecimiento de virus rPIV3 wt y mutantes a 32 °C y 20 °C en monocapas de células L-132 confluentes preparadas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Se inocularon pocillos por duplicado de cada una de las dos placas con 0,2 ml de cada virus rPIV3 wt o mutante a una multiplicidad de infección de 0,01. Después de una adsorción de una hora a temperatura ambiente, el inóculo se aspiró y las monocapas se lavaron con 1 ml de PBS por pocillo. Los cultivos inoculados se cubrieron con 0,5 ml de MEM de Earl complementado con FBS al 10%, glutamina 2 mM, Hepes 20 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM y 100 unidades de estreptomycin-neomicina/ml. Se selló una placa en una bolsa impermeable (Kapak) y después se sumergió en un baño a 20 °C durante 13 días. La placa duplicada se puso a 32 °C en una incubadora de CO₂ durante 3 días. Al final del periodo de incubación, se recogieron los virus por congelación/descongelación. El título de virus recuperado de cada pocillo se determinó por ensayo de placas en células LLC-MK2 a 32 °C usando hemadsorción con eritrocitos de cobaya para visualizar las placas. Se usaron dos soluciones madre de referencia de *cp45* y dos wt como controles.

Estudios de hámsteres

[0165] Se inocularon hámsteres sirios dorados de 5 semanas de edad en grupos de cinco por vía intranasal con 0,1 ml de OptiMEM I por animal que contenía 10^{6,0} ufp de rPIV3 JS wt, virus PIV3 *cp45* o uno de los rPIV3 mutantes. El día 4 post-infección, los hámsteres se sacrificaron, se extirparon los pulmones y los cornetes nasales, y el virus se cuantificó como se ha descrito anteriormente. Se calculó la media del log₁₀ de la DICT₅₀/g a 32 °C para cada grupo de hámsteres.

60

RESULTADOS

Introducción de las mutaciones de PIV3 *cp45* en rPIV3 JS wt

5 **[0166]** Las quince mutaciones en el líder 3', la señal GS de N y las proteínas N, C, M, F, HN y L de *cp45* (Tabla 8) se introdujeron en el ADNc antígenómico de PIV3 completo mediante mutagénesis dirigida o mediante amplificación directa por PCR de un segmento de ADNc de *cp45* que lleva las mutaciones deseadas. Se generaron los ADNc antígenómicos siguientes (véase la Fig. 13): (i) *rcp45* 3'N, que contiene las cuatro mutaciones puntuales de la región líder, la mutación puntual en la señal GS de N y los dos cambios de aminoácidos en la proteína N; (ii) *rcp45* C, que
10 contiene un solo cambio de aminoácido en la proteína C; (iii) *rcp45* M, que contiene un solo cambio de aminoácido en M, (iv) *rcp45* F, que contiene los dos cambios de aminoácidos en F; (v) *rcp45* HN, que contiene un solo cambio de aminoácido en HN; (vi) *rcp45* L, que contiene los tres cambios de aminoácido en L, como se ha descrito anteriormente; (vii) *rcp45* 3'NL, que contiene las mutaciones de i. a vi. anteriores; (viii) *rcp45* 3'NCMFHN, que
15 contiene todas las mutaciones excepto por las tres en L; y (ix) *rcp45*, que contiene las quince mutaciones de *cp45* enumeradas en la Tabla 8. En la mayoría de los casos, cada cambio de *cp45* se modificó por ingeniería genética para que estuviera acompañado de uno o más cambios silenciosos cercanos que introducían o eliminaban un sitio de reconocimiento de enzima de restricción (Tabla 8). Estos servían como marcadores para confirmar la presencia de la mutación en el ADNc y en el virus recuperado. Además, dos de los cambios de codificación de aminoácido (mutaciones números 10 y 15 en la Tabla 8) se realizaron usando dos cambios de nucleótidos en lugar del cambio
20 único encontrado en *cp45*, reduciendo las posibilidades de reversión a wt en el mismo sitio. El ADNc de *cp45*, que contiene los quince cambios de *cp45* en la Tabla 8, se ensambló a partir de los mismos subclones de ADNc mutado que se usaron para introducir los cambios de *cp45* en otros ADNc antígenómicos; se secuenció en su totalidad, y se confirmó que contenía sólo las mutaciones deseadas. Esto indicaba que todas las regiones que se habían sometido a mutagénesis o PCR y que se habían manipulado por clonación poseían las secuencias deseadas y carecían de
25 otras mutaciones no deseadas. Cada plásmido de longitud completa que lleva una o más de las mutaciones de *cp45* se transfeció en células HEp-2 con plásmidos de soporte y MVA-T7 para producir PIV3 recombinante como se ha descrito anteriormente. El análisis de fragmentos de RT-PCR que incluía las mutaciones indicadas en la Tabla 8 que se amplificaron a partir de ARN de virión de los diversos virus recombinantes indicados en la Figura 13 confirmó la presencia de las mutaciones introducidas, y no se encontraron otras mutaciones no deseadas.

Morfología de placas

[0167] Varios de los virus recombinantes presentaban morfologías de placas distintivas cuando se ensayaban en células LLC-MK2. Las placas de rPIV3 JS wt tenían un promedio de 1mm de tamaño y eran indistinguibles en
35 tamaño del PIV3 JS wt derivado biológicamente. Las placas de los virus *cp45* y *rcp45* eran mayores que las del wt, teniendo un promedio de dos a tres veces mayor en diámetro que el wt, y eran indistinguibles entre sí. Esto demostró la posibilidad de comparación de los virus *cp45* recombinantes y derivados biológicamente para este fenotipo.

40 Eficacia de formación de placas de rPIV3 que llevan las mutaciones de *cp45* en células LLC-MK2 a temperaturas permisivas y restrictivas

[0168] Los rPIV3 se ensayaron para determinar su capacidad para formar placas a temperaturas permisivas y restrictivas que variaban de 32 °C a 41 °C (Tabla 9). El análisis de los fenotipos *ts* de virus que llevan componentes
45 individuales de *cp45* puso de manifiesto que los virus *rcp45* 3'N y *rcp45* M tenían una temperatura de interrupción de 40 °C, y el mutante *rcp45* C tenía una temperatura de interrupción de 41 °C. La temperatura de interrupción de los mutantes *rcp45* F y *rcp45* HN era superior a 41 °C. De acuerdo con los resultados anteriores, el virus *rcp45* L tenía una temperatura de interrupción de 39 °C. Se considera que un virus tiene un fenotipo *ts*, por ejemplo, si su reducción de la replicación a 40 °C (es decir, título a 32 °C menos título a 40 °C) es de aproximadamente ≥ 100 veces
50 la del virus wt a 40 °C. Aplicando esta definición, los presentes resultados indicaban que al menos dos regiones de *cp45* (3'N y L) contribuyen al fenotipo *ts*.

Tabla 9: La eficacia de formación de placas (EOP) de virus recombinantes y derivados biológicamente a temperaturas permisivas y restrictivas

Virus	Título medio de virus ^a (log ₁₀ ufp/ml)								fenotipo <i>ts</i> c
	32 °C	35 °C	36 °C	37 °C	38 °C	39 °C	40 °C	41 °C	
<i>rcp45</i> 3'N	7,1	-	-	7,0	6,4	5,4	<u>4,2</u>	<3,7	+
<i>rcp45</i> C	6,9	-	---	7,0	6,7	6,6	5,9	<u><3,7</u>	-
<i>rcp45</i> M	7,7	-	-	7,4	7,0	6,5	<u>5,3</u>	<3,7	-
<i>rcp45</i> F	7,5	-	-	7,2	6,0	6,6	5,9	5,7	-
<i>rcp45</i> HN	6,4	-	-	6,5	6,2	6,4	4,7	4,4	-
<i>rcp45</i> L	7,3	-	-	7,2	6,7	<u>4,0</u>	<0,7	<0,7	+
<i>rcp45</i> 3'NL	7,3	5,7	<u><0,7</u>	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	-	+
<i>rcp45</i> 3'NCMFHN	7,2	5,6	<u><0,7</u>	2,0	2,4	<0,7	<0,7	-	+
<i>rcp45</i>	8,5	7,5	7,1	6,4	<u>6,0</u>	2,0	<0,7	<0,7	+
<i>cp45</i> ^b	8,3	8,0	7,4	7,0	<u>6,2</u>	2,3	<0,7	<0,7	+
rPIV3 wt	7,3	7,3	7,0	7,4	7,6	7,7	6,8	6,0	-

a. Las placas se enumeraron por tinción con inmunoperoxidasa después de incubación durante 6 días a la temperatura indicada. Los valores son la media de dos experimentos, los valores en negrita son de un solo experimento. Los valores subrayados representan la temperatura no permisiva más baja a la que se produce una reducción de 100 veces de la eficacia de formación de placas en comparación con el título a 32 °C, y éste se define como la temperatura de interrupción de la formación de placas. b. *cp45* está derivado biológicamente y los otros virus son recombinantes. c. Se define que un virus lleva el fenotipo *ts* si su reducción de la replicación a 40 °C (es decir, título a 32 °C menos título a 40 °C) es ≥ 100 veces la del virus wt a 40 °C.

[0169] Como se muestra en la Tabla 9, el *rcp45*, que contiene todas las mutaciones de *cp45*, tenía una temperatura de interrupción de 38 °C, que era idéntica a la del *cp45* derivado biológicamente. Estos resultados muestran que el fenotipo *ts* de *cp45* se reproducía con éxito en *rcp45*. Además, estos resultados validan el análisis de secuencia de *cp45* y la posterior reconstrucción de mutaciones en virus recombinante.

[0170] El virus *rcp45* 3'NCMFHN, que es idéntico al *rcp45* excepto por que carece de las tres mutaciones de L, presentaba una temperatura de interrupción de 36 °C. Puesto que se sabe que las mutaciones de L confieren termosensibilidad individualmente y en combinación, es algo paradójico que el *rcp45* 3'NCMFHN fuera más, en lugar de menos, *ts* que *cp45*. Esto implica que existe una interacción de las mutaciones dentro de *cp45* por la que las mutaciones se compensan entre sí para dar un nivel de termosensibilidad que sea inferior a la suma de los componentes individuales.

[0171] Se construyó el virus *rcp45* 3'NL para investigar si las mutaciones de L interaccionan con las mutaciones de N y/o líder, puesto que se cree que todos estos elementos interaccionan durante la síntesis de ARN. Este virus tenía una temperatura de interrupción de 36 °C, en comparación con la de 40 °C y 39 °C para *rcp45* 3'N y *rcp45* L, respectivamente. Estos resultados sugieren que existe una interacción entre las mutaciones de 3'N y L que da como resultado un aumento de la termosensibilidad. Estos resultados también proporcionan otro ejemplo en el que un subconjunto de mutaciones de *cp45* especifica un nivel de termosensibilidad superior al observado para *rcp45*, que contiene el conjunto completo de mutaciones.

Fenotipo *ca* de rPIV3 que llevan mutaciones de *cp45*

[0172] Los rPIV se analizaron para determinar qué elementos genéticos de *cp45* especificaban el fenotipo *ca* (Tabla 10). Se demostró anteriormente que el *rcp45* L es *ts* y *att*, pero no *ca*. Esto indica que los elementos genéticos que especifican la mayor parte del fenotipo *ca* se localizan fuera de L, y esto se confirmó en el presente estudio. Cada uno de los rPIV que poseen las mutaciones de N y líder 3' eran *ca* excepto *rcp45* 3'NCMFHN, que presentaba un fenotipo intermedio. Esto demuestra que el fenotipo *ca* está especificado en su mayor parte dentro de la región 3'N. El descubrimiento de que el nivel de *ca* de virus que contienen el segmento 3'N es inferior que el de *cp45* o *rcp45* indica que otras regiones de *cp45* contribuyen al fenotipo *ca*, aun cuando esto no sea evidente a partir del análisis de las otras regiones individualmente. El virus *rcp45* 3'NL es más *ca* que el virus *rcp45* 3'N, sugiriendo que las mutaciones de L pueden hacer una contribución modesta. Los virus *cp45* derivado biológicamente y *rcp45* presentan niveles comparables de *ca*, indicando que este fenotipo, como el tamaño de placas y los fenotipos *ts*, se reproducía con éxito en el virus *cp45* recombinante proporcionado en la presente memoria. Por lo tanto, el fenotipo *ca*, como el fenotipo *ts*, es un fenotipo compuesto que refleja contribuciones individuales al fenotipo global, así como contribuciones de elementos genéticos de interacción.

Tabla 10: Crecimiento de PIV3 wt y mutantes a 20 °C en comparación con 32 °C^a
(fenotipo de adaptación al frío)

Virus	20 °C	32 °C	Fenotipo <i>ca</i>
<i>cp45</i> ^b	6,72	8,49	+
<i>rcp45</i>	6,57	8,35	+
<i>rcp45</i> 3'NL	5,02	7,23	+
<i>rcp45</i> 3'N	4,39	8,53	+
<i>rcp45</i> 3'NCMFHN	3,53	8,08	+/-
<i>rcp45</i> L	3,18	7,98	-
<i>rcp45</i> C	2,52	8,32	-
<i>rcp45</i> F	2,47	8,10	-
<i>rcp45</i> HN	2,11	8,01	-
<i>rcp45</i> M	1,76	8,21	-
PIV3 WT	2,57	8,43	-

a. El título de virus se expresa en log₁₀ UFP/ml. b. *cp45* está derivado biológicamente y los otros virus son recombinantes. El fenotipo *ca* se define como un aumento superior a 10 veces en el crecimiento a 20 °C respecto al wt.

5 Crecimiento de los virus mutantes *rcp45* en hámsteres

[0173] Se inocularon grupos de cinco hámsteres sirios dorados por vía intranasal con 10⁶ DICT₅₀ de virus recombinante o derivado biológicamente, y el nivel de replicación de virus en los pulmones y cornetes nasales se determinó cuatro días después (Tabla 11). Se ha demostrado anteriormente que el cuarto día post-inoculación
10 corresponde al máximo de replicación viral en hámsteres para los virus tanto wt como *cp45* (véase, Crookshanks y Belshe, J. Med Virol 13 (3): 243-9, 1984). El virus *rcp45* redujo su replicación aproximadamente 40 veces en los cornetes nasales y 1000 veces en los pulmones, y por lo tanto estaba tan atenuado como el virus *cp45* derivado biológicamente. Estos resultados indican que el fenotipo de atenuación de *cp45* se reproducía con éxito en su versión recombinante. Puesto que cada fenotipo de *cp45* se reproducía totalmente en *rcp45*, las cinco mutaciones
15 adicionales en *cp45* que no se incluyeron en este Ejemplo hacían probablemente una escasa contribución a las propiedades de *cp45*.

Tabla 11: Nivel de replicación en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres^a de PIV3^b wt y mutantes

Virus	Título medio de virus (log ₁₀ DICT ₅₀ /g ± E.E ^c) en:	
	Cornetes nasales	Pulmones
rPIV3 JS wt	6,9 ± 0,2	5,4 ± 0,5
<i>rcp45</i> 3'N	6,5 ± 0,2	3,9 ± 1,1
<i>rcp45</i> C	4,8 ± 0,3	3,1 ± 0,7
<i>rcp45</i> M ^d	6,8 ± 0,2	6,7 ± 0,3
<i>rcp45</i> F	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,6
<i>rcp45</i> HN	6,3 ± 0,2	5,3 ± 1,0
<i>rcp45</i> L	4,2 ± 0,1	2,1 ± 0,3
<i>rcp45</i> 3'NL	4,7 ± 0,2	2,1 ± 0,3
<i>rcp45</i> 3'NCMFHN	5,8 ± 0,3	2,9 ± 0,9
<i>rcp45</i>	5,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2
<i>cp45</i>	4,9 ± 0,4	1,9 ± 0,2

a. A grupos de cinco hámsteres cada uno se les administró por vía intranasal 10^{6,0} DICT₅₀ de virus por animal en un inóculo de 0,1 ml y se extirparon los pulmones y los cornetes nasales cuatro días después. b. El *cp45* es un virus derivado biológicamente, los otros virus son recombinantes. c. DICT₅₀, 50% dosis infecciosa tisular ± Error Estándar. d. Se descubrió que la combinación de virus usada en este estudio contenía un fenotipo de placas mixto. El fenotipo de atenuación de este mutante se reevaluará usando preparaciones de virus adicionales.

20

[0174] Como se ha demostrado anteriormente, las mutaciones en el gen de L de *cp45* especifican la mayoría del fenotipo de atenuación de este virus. En el presente Ejemplo, se examinó la contribución de las mutaciones de *cp45* fuera de L como grupo. El mutante *rcp45* 3'NCMFHN reducía solo ligeramente su replicación en los cornetes nasales, pero reducía más de 100 veces su replicación en los pulmones, lo que demuestra que estaban presentes mutaciones atenuantes adicionales fuera de la proteína L. De forma importante, si cada una de las tres mutaciones
25 en el gen de L de *rcp45* revertía a la secuencia de tipo silvestre, el virus resultante, *rcp45* 3'NCMFHN, conservaría todavía el fenotipo de atenuación. Los virus mutantes *rcp45* M y *rcp45* HN no eran defectuosos para la replicación en el tracto respiratorio de hámsteres, y el virus *rcp45* 3'N mostraba sólo una disminución ligera de la replicación en el tracto respiratorio inferior. Esto sugiere que las mutaciones presentes en el líder 3', en el sitio de inicio del gen de

N y en las proteínas N, M y HN no eran por sí mismas atenuantes. Sin embargo, estas mutaciones podían contribuir a la atenuación global de *cp45* en el contexto de las otras mutaciones de *cp45*. Además, mutaciones individuales dentro de la región 3'N pueden tener efectos que no sean evidentes cuando el conjunto de mutaciones se analiza en su conjunto, que pueden determinarse fácilmente de acuerdo con la presente descripción.

[0175] La replicación de los virus mutantes *rcp45* C y *rcp45* F se reducía aproximadamente 100 veces tanto en los cornetes nasales como en los pulmones, demostrando que las mutaciones presentes en las proteínas C y F de *cp45* confieren el fenotipo de atenuación en hámsteres, aunque el nivel de atenuación no es tan grande como el conferido por las mutaciones de L de *cp45*. Como se ha descrito anteriormente, los virus mutantes *rcp45* F y *rcp45* C no poseían el fenotipo *ts* y, por lo tanto, las mutaciones que aparecen en las proteínas C y F se consideran mutaciones atenuantes no *ts*.

EJEMPLO XI

15 Recuperación de PIV3 quimérico recombinante en el que las glicoproteínas hemaglutinina y de fusión se han sustituido con las glicoproteínas de PIV1 correspondientes

[0176] Dentro del presente ejemplo, se genera y se selecciona un virus rPIV quimérico que incorpora uno o más genes heterólogos o secuencias polinucleotídicas grandes de un PIV en un fondo rPIV diferente. Dentro de este aspecto de la invención, los genes o segmentos génicos individuales de un PIV se sustituyen por una secuencia o secuencias homólogas de un PIV heterólogo u otra fuente. En una realización descrita en el presente Ejemplo, se proporcionan herramientas y métodos para sustituir, por ejemplo, los antígenos protectores HN y/o F del HPIV1 o HPIV2 en un HPIV3 recombinante para dar un recombinante quimérico adecuado para desarrollar vacunas vivas atenuadas.

Virus y células

[0177] La cepa de PIV1 usada en este estudio, PIV1/Washington/20993/1964 (PIV1/Wash64), se aisló en Washington DC en 1964 y se confirmó que era un virus de tipo silvestre virulento en estudios clínicos en voluntarios humanos adultos (Murphy et al. Infect. Immun. 12: 62-8 (1975)). Se propagó en células LLC-MK2 (ATCC CCL 7.1) en Opti-MEM I (Life Technologies) con sulfato de gentamicina 50 µg/ml, glutamina 2 mM y tripsina 0,75 µg/ml (Nº Catálogo 3741, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). La cepa Greer del PIV2 humano (Nº Catálogo V-322-001-020, NIAID Repository, Rockville, MD) usada en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) se propagó de la misma forma. La cepa JS del virus PIV3 humano y su derivado recombinante a partir de ADNc (rPIV3/JS) con fenotipo de tipo silvestre se propagaron como se ha descrito anteriormente. El recombinante de vaccinia modificado Ankara (MVA) que expresa la ARN polimerasa del bacteriófago T7 se describe en Wyatt et al., Virology 210: 202-205 (1995).

[0178] Las células HEp-2 se obtuvieron de la ATCC (ATCC CCL 23) y se mantuvieron en Opti-MEM I (Life Technologies) con suero bovino fetal al 2% (FBS), sulfato de gentamicina 50 µg/ml y glutamina 2 mM.

Construcción de un ADNc que codifica un antígeno de PIV3-PIV1 quimérico completo

[0179] Se construyó un ADNc que codificaba un ARN antígeno de PIV3 de longitud completa en el que las ORF de HN y F de PIV3 se sustituyeron por sus homólogos de PIV1, como se muestra en la Figura 14. Se prepararon clones de ADNc de los genes de HN y F de PIV1/Wash64 a partir de ARN extraído de células LLC-MK2 que se habían infectado con virus de tipo silvestre PIV1/Wash64. Se generó el ADNc usando el sistema de preamplificación SuperScript usando cebadores hexaméricos aleatorios (Life Technologies). Se amplificaron ADNc de F y HN de PIV1 con ADN polimerasa Vent (New England Biolabs, Beverly, MA) usando parejas de cebadores específicos de gen basados en secuencias de consenso presentes en GenBank. Todos los cebadores descritos a continuación se anotaron de modo que las secuencias específicas de PIV están subrayadas, los sitios de restricción están en cursiva, los nucleótidos alterados a partir de secuencias de tipo silvestre están en minúsculas y los codones de inicio y de terminación están en negrita. El cebador de F de PIV1 de sentido positivo, que hibrida con los nucleótidos 69-97 cadena arriba del codón de inicio, era 5'-GGGAAAGAAtCCAGAGAGAAGAACGG-3' (SEC ID Nº: 33). El cebador de F de PIV1 de sentido negativo, que hibrida con los nucleótidos 36-61 cadena abajo del codón de terminación de F, era 5'-GGTGAAGTGGATccATTGATTG-3' (SEC ID Nº: 34). Lleva un sitio BamH I. El cebador de sentido positivo para HN de PIV1 era 5'-CAACCTGTAAGGTAcCACATCCG-3' (SEC ID Nº: 35). Hibrida con los nucleótidos 13-36 cadena arriba del codón de inicio de HN y lleva un sitio Kpn I. El cebador de HN de PIV1 de sentido negativo era 5'-GATATGGTGTaGGcCTTGATCTGTTC-3' (SEC ID Nº: 36). Hibrida con los últimos dos nucleótidos del codón de terminación y con 25 nucleótidos más cadena abajo y lleva un sitio Stu I. El ADNc de F de PIV1 se clonó como un fragmento BamH I y de extremo romo en pLITMUS28 digerido con BamH I-EcoR V (New England Biolabs), mientras que el ADNc de HN de PIV1 se clonó como un fragmento Kpn I-Stu I en el mismo vector. Las secuencias de nucleótidos de los plásmidos resultantes, denominados pLit.1HNwt y pLit.1Fwt (números de

acceso de GenBank: AF016280, AF016279), se determinaron usando el kit de secuenciación Circumvent (New England Biolabs). Estos dos clones se modificaron usando cebadores de PCR mutagénicos para delecionar sus regiones no codificantes e introducir nuevos sitios de restricción que flanqueasen sus codones de inicio y de terminación con el fin de construir los genes de HN y F quiméricos de PIV3-1. Las secuencias de cebadores mutagénicos de F de PIV1 de sentido positivo y de sentido negativo eran 5'-Cgcc**ATGg**AAAAATCAGAGATCCTCTTCT-3' (SEC ID N°: 37) y 5'-Ctggatcct**AATTGGAGTTGTTACCCATGTA**-3' (SEC ID N°: 38), respectivamente, los sitios de restricción introducidos son Nco I y BamH I. Las secuencias de cebadores mutagénicos de HN de PIV1 de sentido positivo y de sentido negativo eran 5'-AACc**ATGGCTGAAAAAGGGAAAA**-3' (SEC ID N°: 39) y 5'-GGTGAA**GCTtAAGATGTGATTTTACATATTTTA**-3' (SEC ID N°: 40), respectivamente, los sitios de restricción introducidos son Nco I y Hind III.

[0180] La segunda etapa implicaba la modificación de los genes de HN y F de PIV3 para servir como aceptores de las regiones codificantes de PIV1 generadas anteriormente. Los genes de F y HN de PIV3 se subclonaron en varias etapas a partir del clon de longitud completa de PIV3/JS, p3/7(131)2G, para generar el pLit.PIV3.HN.4 y el pLit.PIV3.F.3a (Fig. 14). Las regiones codificantes de F o HN de PIV3 se delecionaron mediante mutagénesis por PCR y se sustituyeron por sitios de restricción apropiados para aceptar el ADNc de HN y de F de PIV1 descrito anteriormente. Las secuencias de los cebadores mutagénicos de sentido positivo y de sentido negativo de F de PIV3 eran 5'-AAATAggatcc**CTACAGATCATTAGATATTA**AAAT-3' (SEC ID N°: 41) y 5'-Cgc**CATgGTGTT**CAGTGCTTGTG-3' (SEC ID N°: 42), respectivamente, los sitios de restricción introducidos eran BamH I y Nco I. Las secuencias de cebadores mutagénicos de sentido positivo y de sentido negativo de HN de PIV3 eran 5'-CCACAAG**CtTAATTAACCATATATGCATCA**-3' (SEC ID N°: 43) y 5'-TTCCATgg**ATTTGGATTGTCTATTGGGT**-3' (SEC ID N°: 44), respectivamente, los sitios de restricción introducidos eran Hind III y Nco I. El codón de terminación para el HN quimérico se regeneraría tras la ligación con el casete de HN de PIV1 mutado. Los ADNc de HN o F de PIV1 descritos anteriormente se importaron como un fragmento Nco I-Hind III para HN o como un fragmento Nco I-BamH I para F, que generaban el pLit.PIV3-1.HNhc y el pLit.PIV3-1.Fhc. Estos dos ADNc se unieron después en el pSE.PIV3-1.hc, que se secuenció posteriormente en su totalidad. Después, el fragmento BspE I-Sph I se insertó en p3/7(131)2G para generar el pFLC.2G+.hc- (Fig. 14). La secuencia de nucleótidos de este fragmento BspE I-Sph I, que contiene los genes de F y HN quiméricos, está en GenBank (N° Acceso AF016281). De forma importante, la modificación por ingeniería genética del ADNc estaba diseñada de modo que el antígeno de rPIV3-1 final se ajustase a la regla de seis (Durbin et al. Virology 234: 74-78 (1997)). El plásmido pFLC.2G+.hc, que codifica la quimera rPIV3-1, se depositó el 17/9/97 bajo los términos del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos.

[0181] Transfección. Se cultivaron monocapas de células HEP-2 hasta la confluencia en placas de seis pocillos (Costar Corp, Cambridge, MA) y se realizaron transfecciones como se ha descrito anteriormente. Las monocapas de células se infectaron con MVA-T7 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 en 0,8 ml de Opti-MEM I sin suero que contenía gentamicina 50 µg/ml y glutamina 2 mM, y después se transfectaron con los tres plásmidos de soporte, 0,4 µg de pTM(N), 0,4 µg de pTM(P), 0,05 µg de pTM(L) y 5 µg del ADNc antígeno de PIV3-1. Los plásmidos se mezclaron en 0,2 ml de Opti-MEM I que contenía 12 µl de LipofectACE (Life Technologies) y se añadieron a cada pocillo. El plásmido de ADNc de PIV3/JS, p3/7(131)2G, que codifica el ARN antígeno de PIV3/JS de tipo silvestre, se transfectó en paralelo como control positivo. Después de la incubación a 32 °C durante 12 horas, el medio de transfección se sustituyó con 1,5 ml de Opti-MEM I recién preparado complementado con gentamicina 50 µg/ml, y los cultivos se incubaron a 32 °C durante dos días adicionales. Se añadió tripsina a una concentración final de 0,75 µg/ml el día 3 post-transfección. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular el día 4 y se pasaron (denominado pase 1) sobre monocapas de células LLC-MK2 recién preparadas. Después de la adsorción durante una noche, el medio se sustituyó con Opti-MEM I recién preparado con tripsina 0,75 µg/ml. Los cultivos del pase 1 se incubaron a 32 °C durante 4 días y el virus amplificado se recogió y se pasó adicionalmente sobre células LLC-MK2 (denominado pase 2) durante otros 4 días a 32 °C en presencia de tripsina 0,75 µg/ml. El virus recuperado se caracterizó por reacción con antisuero de PIV1 de conejo, antisuero de PIV2 de cobaya y dos anticuerpos monoclonales de HN de PIV3 en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI), como se ha descrito anteriormente (van Wyke Coelingh et al., anteriormente, (1985)) con la excepción de que se usaron eritrocitos (RBC) de pollo para virus que poseían las glicoproteínas HN de PIV1, mientras que se usaron RBC de cobaya para PIV3. El HAI se realizó para determinar si el rPIV3 poseía la mutación de resistencia a anticuerpos monoclonales (MARM) que marcaba el virus recuperador a partir de ADNc, o si el rPIV3-1 poseía la HN de PIV1.

[0182] Análisis de secuencia de nucleótidos. La construcción de ADNc quimérica pSE.PIV3-1.hc se secuenció con el kit de secuenciación Circumvent (New England Biolabs) antes del ensamblaje final en el clon de longitud completa pFLC.2G+.hc. Para el análisis de ARN, los PIV apropiados se amplificaron en matraces T75 de células LLC-MK2. El virus se recogió el día 5 post-infección y se concentró por precipitación con polietilenglicol (Mbiguino et al., J. Virol. Methods 31: 161-70 (1991)). Se extrajo el ARN viral de los sedimentos virales y se usó en una transcripción inversa (RT) con el sistema de preamplificación Superscript (Life Technologies). Se realizó una RT-PCR usando el kit de síntesis de ADNc Advantage (Clontech) y parejas de cebadores específicos de PIV1 o PIV3.

Los productos de RT-PCR se purificaron en gel mediante electroforesis sobre, y se eluyeron a partir de, tiras de membrana de DEAE nitrocelulosa NA45 (Schleicher & Schuell, Keene, NH) y se secuenciaron.

[0183] Replicación de PIV en células LLC-MK2. Se realizó la enumeración de las placas en monocapas de LLC-MK2 como se ha descrito anteriormente, excepto por que se añadió tripsina en el caso de los virus PIV1 y rPIV3-1 (Hall et al. Virus Res. 22:173-84 (1992)). En resumen, se inoculó virus diluido en serie sobre monocapas de LLC-MK2 en placas de seis pocillos; el virus se adsorbió durante 1 hora a 32 °C; los cultivos se cubrieron con medio L-15 (Life Technologies) que contenía agarosa al 0,8% con o sin tripsina añadida y se incubaron a 32 °C durante 6 días; y las placas se identificaron por hemadsorción (HAD) con eritrocitos de cobaya después de la eliminación de la capa de agarosa.

[0184] El crecimiento de los virus PIV en cultivo tisular se evaluó infectando monocapas de LLC-MK2 confluentes en placas de doce pocillos con virus a una MOI de 0,01. Después de la adsorción a 32 °C durante 1 hora, el inóculo se sustituyó con 1,5 ml/pocillo de Opti-MEM I complementado con gentamicina (50 µg/ml) y tripsina (0,75 µg/ml) y se incubaron adicionalmente a 32 °C durante 6 días. A intervalos de 24 horas se retiraron 0,3 ml de medio de cada pocillo y se añadieron de nuevo 0,3 ml de medio recién preparado con tripsina. El título de virus se determinó a 32 °C mediante un ensayo de hemadsorción sobre monocapas de células LLC-MK2 usando una capa de fluido como se ha descrito previamente (Hall et al. Virus Res. 22: 173-84 (1992)) y los títulos se expresaron como log₁₀ de la DICT₅₀/ml.

[0185] Replicación de PIV en el tracto respiratorio de hámsteres. Hámsteres sirios dorados en grupos de 12 se inocularon cada uno por vía intranasal con 0,1 ml de medio L-15 que contenía 10⁵ ufp de rPIV3/JS, rPIV3-1 o PIV1/Wash64. Los días 4 y 5 días post-inoculación se sacrificaron seis hámsteres de cada grupo y sus pulmones y cornetes nasales se extirparon y se homogeneizaron, y el virus presente en las muestras se tituló en monocapas de células LLC-MK2 a 32 °C. Los títulos se expresaron como media del log₅₀ de DICT₅₀/g para cada grupo de seis hámsteres.

RESULTADOS

La construcción de un clon de ADNc que codifica un ARN antigenómico de PIV3-1 quimérico de longitud completa producía la recuperación del virus quimérico rPIV3-1

[0186] Como se ha señalado anteriormente, la construcción final del ADNc quimérico de PIV3 y PIV1 en la que las ORF de los genes de las glicoproteínas HN y F de PIV3 JS de tipo silvestre se sustituyeron por las de las secuencias codificantes de PIV1/Wash64 (Figuras 14A y 14B) codifica un ARN antigenómico quimérico de PIV3-1 de 15.516 nucleótidos que se ajusta a la regla de seis (Durbin et al., Virology 234: 74-78 (1997)). El ADNc de pFLC.2G+.hc que codifica el antigenoma de PIV3-1 quimérico se transfeció sobre células HEp-2 junto con los plásmidos de soporte N, P y L. El ADNc de p3/7(131)2G que codifica el antigenoma de PIV3 JS wt se transfeció en paralelo para generar un virus parental de control rPIV3. El virus se recuperó de cada transfección después de la segunda amplificación en células LLC-MK2 y se iniciaron estudios para confirmar que cada virus recombinante procedía de ADNc.

[0187] Los virus recombinantes rPIV3-1 y rPIV3 se caracterizaron primero por la presencia de la glicoproteína HN de PIV1 o PIV3 mediante ensayo de HAI con anticuerpos policlonales o monoclonales anti-HN específicos de serotipo. Como se muestra en la Tabla 12, el rPIV3 reaccionaba con solo uno de los dos mAb de PIV3, como se esperaba, mientras que su PIV3/JS parental derivado biológicamente reaccionaba con ambos. Esto confirmó que el rPIV3 contenía la mutación MARM introducida que marca a este virus como derivado de ADNc. El virus rPIV3-1 reaccionó con anticuerpos específicos contra la glicoproteína HN de PIV1, pero no con los específicos contra HN de PIV3 o PIV2, demostrando que el virus contenía el gen de HN de PIV1 como se esperaba.

Tabla 12. El rPIV3-1 posee la glicoproteína HN de PIV1

Título de inhibición de la hemaglutinación ^a (inversa) del antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal indicado				
Virus	antisuero de PIV1 ^b	antisuero de PIV2 ^b	mAb 423/6 α -PIV3 ^c	mAb 77/5 α -PIV3 ^c
PIV1/Wash64	256	32 ^d	≤ 50	≤ 50
rPIV3-1	64	≤ 2	≤ 50	≤ 50
rPIV3/JS	4	≤ 2	≤ 50	3.200
PIV3/JS	8	≤ 2	12.800	6.400
PIV2/Greer	8	512	≤ 50	≤ 50

^aSe usaron eritrocitos (RBC) de pollo en el ensayo de HAI para PIV1, PIV2 y rPIV3-1 y se usaron RBC de cobaya para PIV3/JS y rPIV3/JS. ^bSe adquirió antisuero de conejo contra PIV1 de Denka Seiken Co. Ltd., Japón (Nº Catálogo 410-701) y se obtuvo antisuero de cobaya contra PIV2 del NIAID repository, Rockville, MD (Nº Catálogo V-322-50-558). ^cEl PIV3/JS derivado biológicamente contiene epítopos reconocidos por ambos mAb 423/6 y 77/5, mientras que el rPIV3/JS estaba modificado por ingeniería genética para que careciera de reactividad con el mAb 423/6. ^dEl antisuero contra PIV2 tenía cierta reactividad con el virus PIV1 y, por lo tanto, no era completamente específico de tipo.

[0188] A continuación se confirmó que el virus rPIV3-1 contenía los genes de HN y F de PIV3-1 quiméricos modificados por ingeniería genética. Según estaba diseñado, la estructura genética de rPIV3-1 era única en cuatro regiones de unión en comparación con cualquiera de sus parentales, PIV1/Wash64 o rPIV3/JS (recuadrados en la Figura 15A). Estas regiones eran los puntos de transición en los que la secuencia cambia de la región no codificante de PIV3 a la región codificante de PIV1, y después de la región codificante de PIV1 de nuevo a la región no codificante de PIV3. Usando la pareja de cebadores A específica para los genes de M y L de PIV3, o la pareja de cebadores B específica para la M y el extremo más 3' del gen de HN de PIV1, se generaron productos de RT-PCR para ARN derivados de virión de rPIV3-1, rPIV3/JS y PIV1/Wash64. Las reacciones de control mostraban que la etapa de RT era necesaria para la generación de productos de RT-PCR, indicando que era necesario un molde de ARN, más que ADN contaminante, para producir el producto de RT-PCR. Un indicio temprano de que rPIV3-1 era de hecho un virus quimérico vino del descubrimiento de que sólo la pareja de cebadores A específica de PIV3 generaba el producto de ADNc de 4,6 kb esperado que abarca los genes de F y HN (Fig. 15B). Por lo tanto, mientras que el virus rPIV3-1 contiene sólo la glicoproteína HN específica de HPIV1 (Véase la Tabla 12), las regiones no codificantes son específicas para PIV3. Por el contrario, la pareja de cebadores B específica de PIV1 amplificaba un producto apropiadamente dimensionado de control de PIV1, pero no de rPIV3-1. El análisis de la digestión con enzimas de restricción también demostró que el producto de RT-PCR de rPIV3-1 tenía patrones de restricción únicos diferentes de los de rPIV3/JS y PIV1/Wash64 y apropiados para su secuencia esperada.

[0189] La secuencia de nucleótidos del producto de RT-PCR de 4,6 kb de rPIV3-1 se determinó en sus cuatro regiones (Fig. 15 A) y se comparó con la de rPIV3/JS y PIV1/Wash64 (Fig. 16). La secuencia de rPIV3-1 concordaba completamente con el ADNc del que procedía. El examen del alineamiento de secuencia de la Región I-IV para los tres productos de RT-PCR ilustra que el rPIV3-1 contiene las ORF de las glicoproteínas F y HN de PIV1 con codones de inicio y de terminación alterados y flanqueados por las regiones no codificantes 5' y 3' de PIV3. Se evaluaron ejemplos de escaleras de secuenciación que abarcan la Región III y IV de rPIV3-1 (Figuras 17A y 17B), comparados en paralelo con rPIV3/JS o PIV1/Wash64, y este análisis confirmó que rPIV3-1 es un virus quimérico recombinante cuya estructura concuerda completamente con el ADNc a partir del cual se generó.

30 Dependencia de tripsina y actividad citopática de rPIV3-1 *in vitro*

[0190] El PIV1, como el virus Sendai, pero al contrario que el PIV3, requiere tripsina para la escisión de su glicoproteína F para experimentar una replicación multicíclica en líneas continuas de células de cultivo celular (Frank et al. J. Clin. Microbiol. 10: 32-6 (1979)). Además, el PIV1 es un virus no citopático, mientras que el PIV3 produce fácilmente un amplio CPE (Collins et al. en Fields Virology, 3ª ed., 1: 1205-43 (1996)). El rPIV3-1, rPIV3 y PIV1/Wash64 se compararon basándose en estas propiedades. El rPIV3-1, como el PIV1/Wash64, tenían un título de HA superior usando RBC de pollo, más que de cobaya (Tabla 13). El rPIV3-1, como su parental PIV1/Wash64, requería tripsina para una replicación eficaz en cultivos con una capa de fluido, así como para una formación de placas eficaz. El rPIV3-1 producía placas a 32 °C, 37 °C o 40 °C con una eficacia similar. Por lo tanto, es evidente que el rPIV3-1 posee la glicoproteína F del virus parental PIV1 y no es termosensible. Por otro lado, el CPE producido por rPIV3-1, como se indica por el redondeamiento y desprendimiento de células en las monocapas infectadas con virus, es casi en la misma medida que su PIV3 parental, sugiriendo que esta propiedad biológica está en función de sus genes de PIV3, que se encuentran fuera de las regiones codificantes de HN y F. Por lo tanto, el rPIV3-1 posee propiedades biológicas de ambos parentales que concuerdan con los descubrimientos anteriores, demostrando que es un virus quimérico. Este virus quimérico recombinante ejemplar dentro de la invención se depositó el 21 de mayo de 1998 bajo los términos del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos.

Tabla 13. Comparación del título de HA y de la infectividad y actividad citopática de PIV parentales y quiméricos^a

Virus	Título de HA usando los RBC indicados		Título infeccioso ^b (Log ₁₀ DICT ₅₀ /ml) usando CPE o HAD como criterio de valoración				UFP/ml ^c (Log ₁₀)	
	Pollo	Cobaya	CPE		HAD		Tripsina	
			Tripsina		Tripsina			
			-	+	-	+		
PIV1/Wash64	16	8	≤2,5	≤2,5	4,8 ^d	6,3	≤0,7 ^e	5,8
rPIV3-1	64	16	≤2,5	5,8	5,5 ^d	7,8	≤0,7 ^e	7,1
rPIV3/JS	0	8	4,5	7,3	5,0 ^d	7,5	5,0	6,2

^aSe cultivaron reservas de virus en células LLC-MK2 que se infectaron a una MOI de 0,01 y se incubaron durante 6 días en presencia (PIV1/Wash64, rPIV3-1) o ausencia (rPIV3/JS) de tripsina 0,75 µg/ml. Las reservas de virus resultantes se ensayaron mediante los ensayos a continuación en presencia o ausencia de tripsina, según se indica.

^bEl ensayo de la DICT₅₀ se leyó a los 6 días por visualización directa del CPE o por hemadsorción (HAD).

^cLas placas se visualizaron por HAD después de seis días de incubación.

^dLa HAD de monocapas infectadas con PIV3 era macroscópicamente evidente, mientras que la de PIV1 y rPIV3-1 era observable sólo bajo el microscopio, en el que se observaron células individuales con RBC adsorbidos.

^eEl menor nivel de virus detectable era de 10^{0,7}/ml.

Comparación del nivel de replicación de rPIV3-1 y sus virus parentales en células LLC-MK2 y hámsteres

- 5 **[0191]** La replicación multicíclica de los virus rPIV3, rPIV3-1 y PIV1 Wash/64 se evaluó después de la inoculación de células de cultivo tisular LLC-MK2 a una MOI de 0,01 (Fig. 18). Puede observarse que la cinética y la magnitud de la replicación de los tres virus eran muy similares. Esto indica que la sustitución de los genes de HN y F de PIV1 en lugar de los PIV3 no atenuaba el virus para su replicación *in vitro*. A continuación se determinó si el rPIV3-1 se atenuaba *in vivo*, específicamente para la replicación en los tractos respiratorios superior e inferior de hámsteres
- 10 (Tabla 14). El nivel observado de replicación de rPIV3-1 era similar a, si no ligeramente superior a, cualquier parental en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres.

Tabla 14. Nivel de replicación de PIV parentales y quiméricos en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres^a

Virus	Título de virus (media en log ₁₀ de la DICT ₅₀ del tejido indicado/gramo ± E.E.)			
	Cornetes Nasales		Pulmones	
	Día 4	Día 5	Día 4	Día 5
PIV1/Wash64	5,2 ± 0,24	5,2 ± 0,12	5,0 ± 0,31	5,0 ± 0,38
rPIV3-1	4,9 ± 0,23	6,2 ± 0,17	5,8 ± 0,15	6,0 ± 0,09
rPIV3/JS	4,5 ± 0,09	5,0 ± 0,18	5,1 ± 0,26	5,0 ± 0,32

^aLos hámsteres se infectaron por vía intranasal con 10^{5,0} DICT₅₀ por animal del virus indicado, y los pulmones y cornetes nasales se extirparon el día 4 ó 5 después de la infección. Los títulos son las medias de seis animales por día y se expresan como la media del log₁₀ DICT₅₀/gramo ± error estándar.

- 15 **[0192]** En resumen, el presente Ejemplo demuestra la recuperación con éxito de un virus quimérico rPIV3-1 en el que las ORF de las glicoproteínas HN y F de PIV1 sustituyeron a las de rPIV3. Este virus quimérico se replicaba como sus virus parentales PIV1 y PIV3 de tipo silvestre *in vitro* e *in vivo*, demostrando que la sustitución de las ORF de glicoproteínas no daba como resultado la atenuación del rPIV3-1. Esta recuperación con éxito de un PIV3
- 20 recombinante que lleve las glicoproteínas HN y F de PIV1 es sorprendente porque los dos virus, que representan distintos serotipos, no están estrechamente relacionados. En particular, es sorprendente que el recombinante quimérico crezca tan bien como los dos parentales. Particularmente, también se han recuperado virus recombinantes quiméricos que poseen una sustitución en el gen de glicoproteína para el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Lawson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-81 (1995)). En concreto, el gen de las
- 25 glicoproteínas G de VSV de serotipo Indiana se sustituyó por el del serotipo New Jersey, que comparte una identidad de secuencia de aminoácidos de sólo el 50%. Al contrario que el rPIV3-1 el VSV_{I/NJ} recombinante quimérico se replica sólo al 10% del nivel del VSV_I recombinante o VSV derivado biológicamente.

- 30 **[0193]** En el presente Ejemplo, las glicoproteínas HN y F tienen una identidad de secuencia del 43 y del 47%, respectivamente, entre PIV1 y PIV3. La transferencia de las dos glicoproteínas juntas evitaría, por supuesto, la incompatibilidad de glicoproteína con glicoproteína (Tanabayashi, K. y Compans, R. W. J. Virol. 70: 6112-18 (1996)). Por otro lado, se cree en general que las glicoproteínas interaccionan con la proteína M (que tiene una identidad del 63% entre PIV1 y PIV3) a través de sus dominios citoplasmático (CT) o transmembrana (TM), y que esta interacción es importante en la morfogénesis y la estructura del virión. A este respecto, el grado de identidad de secuencia entre
- 35 las proteínas HN y F de los dos serotipos en los dominios TM y CT es de hecho reducido: 30% y 22%, respectivamente, para el dominio TM, y 9 y 11%, respectivamente, para el dominio CT. A la luz de este escaso nivel de relación de secuencia los inventores también han seguido una estrategia paralela de construcción de

glicoproteínas quiméricas en las que el ectodominio de PIV1 de cada glicoproteína se fusionó con los dominios TM y CT de PIV3. Respecto a la posible interacción con la proteína M u otras proteínas internas, puede ser que una estructura conservaba, tal como una constelación de aminoácidos cargados, sea importante más que una secuencia conservada. Como alternativa, podría ser que la interacción de los dominios TM y CT de las glicoproteínas con proteínas internas no sea tan crítica como se ha pensado anteriormente. Será posible examinar estos factores más de cerca usando los métodos y herramientas proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, estos factores se aclararán adicionalmente por trabajos en curso que emplean los métodos descritos anteriormente para construir un virus PIV3 que lleva HN y F de PIV2.

- 10 **[0194]** Se esperaba que el rPIV3-1 requiriese tripsina para una replicación eficaz en cultivo tisular, puesto que ésta es una propiedad conferida por la glicoproteína F de PIV1, y éste resultó ser el caso. Sin embargo, era interesante observar que el rPIV3-1 causaba un CPE que se parecía más al del virus parental PIV3, indicando que un gen o genes de PIV3 distintos de HN o F especifica este fenotipo. Estos papeles se aclararán también adicionalmente usando los métodos y herramientas proporcionados en la presente memoria para intercambiar un gen o genes adicionales entre el PIV1 no citopático y el PIV3 citopático.

EJEMPLO XII

Recuperación de PIV recombinante quimérico vivo atenuado que codifica las proteínas internas del PIV tipo 3 y las glicoproteínas de superficie del PIV tipo 1

- 25 **[0195]** En el presente Ejemplo, se muestra que un derivado de rPIV3-1 que lleva los tres cambios de codificación de aminoácidos termosensibles y atenuantes que se encuentran en el gen de L del virus vacunal candidato PIV3 cp45 vivo atenuado, denominado rPIV3-1.cp45L, presenta un fenotipo termosensible con una temperatura de interrupción de 38 °C similar a la del rPIV3cp45L recombinante que posee las mismas tres mutaciones. El rPIV3-1.cp45L está atenuado en el tracto respiratorio de hámsteres en la misma medida que el rPIV3cp45L. La infección de hámsteres con rPIV3-1.cp45L genera un nivel moderado de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación contra PIV1 wt e induce una resistencia completa a la exposición con PIV1 de tipo silvestre. Esto demuestra que el PIV quimérico atenuado de acuerdo con la invención era capaz de inducir una respuesta inmune altamente eficaz contra PIV1. Esta descripción también confirma los datos descritos anteriormente, que demuestran que las glicoproteínas de superficie de virus parainfluenza son suficientes para inducir un alto nivel de resistencia a la exposición a virus homólogo. Inesperadamente, la infección con virus quimérico recombinante rPIV3-1.cp45L o rPIV3-1, que llevan cada uno los genes de glicoproteínas de superficie de PIV1 y los genes internos de PIV3, también induce un nivel de resistencia moderado a la replicación de virus de exposición PIV3. Esto indica que los genes internos de PIV3 pueden inducir de forma independiente una inmunidad protectora frente a PIV3 en roedores. Por lo tanto, un sistema genético inverso para PIV3, como se describe en la presente memoria, produce con éxito candidatos a vacunas de PIV1 vivos atenuados que están atenuados y son protectores en sujetos de modelo aceptados.

Virus y células

- 40 **[0196]** La cepa PIV1 wt usada en este estudio es PIV1/Washington/20993/1964 (PIV1/Wash64) (véase, por ejemplo, Murphy et al., Infect. Immun. 12: 62, 1975). El rPIV3-1 quimérico recuperado a partir de ADNc de PIV3 quimérico, en el que las ORF de F y HN de PIV3 se sustituyen con las de PIV1/Wash64, como se ha descrito anteriormente y en Tao et al., J. Virol. 72: 2955, 1998. Estos virus se propagaron en células LLC-MK2 (ATCC CCL 45 7.1) en Opti-MEM I (Life Technologies, Gaithersburg, MD) con sulfato de gentamicina 50 µg/ml y tripsina 0,75 µg/ml (Nº de Catálogo 3741, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). Se incluye tripsina porque la glicoproteína F de PIV1, pero no la de PIV3, depende de tripsina exógena para la escisión cuando se cultiva en un cultivo celular en estas condiciones. La cepa JS wt del virus PIV3 humano y su derivado recombinante a partir de ADNc (rPIV3/JS) se propagaron como se ha descrito anteriormente y en Durbin et al., Virology 235: 323, 1997. La propagación de cp45, un derivado atenuado de PIV3/JS wt (véase anteriormente; y Karron et al., J. Infect. Dis. 171: 1107, 1995) y rPIV3cp45L, un PIV3 recombinante que lleva las tres mutaciones ts encontradas en el gen de L de cp45, se propagaron como se ha descrito anteriormente y en Skiadopoulos et al., J Virol 72: 1762, 1998. El recombinante de vaccinia modificado Ankara (MVA) que expresa la ARN polimerasa del bacteriófago T7 se describe en Virology 210: 202, 1995.
- 50 **[0197]** Las células HEp-2 que se usaron en la transfección se obtuvieron de la ATCC (ATCC CCL 23) y se mantuvieron en Opti-MEM I con suero bovino fetal (FBS) al 2%, sulfato de gentamicina 50 µg/ml.

Introducción de mutaciones de L en ADNc antigenómico de rPIV3-1

- 60 **[0198]** Las tres mutaciones de L de cp45 presentes en el plásmido pTM(L)942/992/1558 descrito anteriormente (véase también, Skiadopoulos et al., J. Virol 72: 1762, 1998), se introdujeron en el ADNc quimérico pFLC.2G+.hc (descrito anteriormente; véase también, Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998), como un fragmento SphI-NheI de 2,8 kb

(nucleótidos 11313 a 14092 en el ADNc antigenómico de PIV3) para generar el pFLC.2G+.hc.cp45L de longitud completa que lleva las ORF de F y HN de PIV1 y las tres mutaciones del gen de L de cp45 (Fig. 19). Las mutaciones específicas presentes en el pTM(L)942/992/1558 se indican en la leyenda para la Figura 19.

- 5 **[0199] Transfección.** Se cultivaron monocapas de células HEp-2 en placas de seis pocillos hasta la confluencia y se realizaron transfecciones como se ha descrito anteriormente (véase también, Tao et al., J virol 72: 2955, 1998). Se añadió tripsina a una concentración final de 0,75 µg/ml el día 3 post-transfección antes de la recogida el día 4. Los sobrenadantes de cultivo celular se aclararon y se pasaron (denominado pase 1) sobre monocapas de células LLC-MK2 recién preparadas. Después de la adsorción durante una noche, el medio se sustituyó con Opti-MEM I
10 recién preparado con tripsina 0,75 µg/ml. Los cultivos de pase 1 se incubaron a 32 °C durante 4 días y el virus presente en el sobrenadante se recogió y se pasó de nuevo en las mismas condiciones (denominado pase 2). El virus presente en la recolección del pase 2 se ensayó para determinar la presencia de la proteína HN de PIV1 mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI), como se ha descrito anteriormente (véase también Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998).

15

Replicación de PIV en LLC-MK2 a diversas temperaturas

- [0200]** Se realizó la enumeración de placas en monocapas de LLC-MK2 como se ha descrito anteriormente, añadiéndose tripsina 0,75 µg/ml a la capa de agarosa en el caso de PIV1, rPIV3-1 y rPIV3-1.cp45L (véase también,
20 Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998). Después de la incubación a diversas temperaturas durante 6 días, la capa de agarosa se eliminó y las placas se identificaron por hemadsorción (HAD) con eritrocitos (RBC) de cobaya.

Replicación de PIV en el tracto respiratorio de hámsteres

- 25 **[0201]** Se inocularon grupos de cinco hámsteres por vía intranasal con 0,1 ml de medio L15 que contenía 10^6 unidades formadoras de placas (UFP) de rPIV3/JS, rPIV3cp45L, cp45, PIV1/Wash64, rPIV3-1 o rPIV3-1.cp45L. Los hámsteres se sacrificaron el día 4 post-infección, y sus pulmones y cornetes nasales se extirparon y se homogeneizaron. El virus presente en las muestras de tejido se tituló en monocapas de células LLC-MK2 a 32 °C, como se ha descrito anteriormente y en Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998. Los títulos se expresan como la inversa de
30 la media del \log_{10} de la $DICT_{50}$ /gramo de tejido para cada grupo.

Estudios de inmunización y exposición en hámsteres

- 35 **[0202]** Se inmunizaron grupos de diez hámsteres por vía intranasal con 10^6 UFP de virus por animal, como se ha descrito anteriormente. Se recogió suero para un ensayo de HAI antes de la infección y el día 33. El nivel de anticuerpos de HAI presentes en los sueros de cada grupo de 10 hámsteres se determinó usando PIV1/Wash64 y PIV3/JS como antígenos, y los títulos de HAI determinados se presentan como la media del \log_2 (véase también, Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998).
40 **[0203]** Treinta y cinco días post-inmunización, cinco hámsteres de cada grupo se expusieron por vía intranasal a 10^6 UFP de PIV1/Wash64 o rPIV3/JS. Los cornetes nasales y pulmones de estos hámsteres expuestos se extirparon cuatro días post-exposición. Se determinaron los títulos de virus en muestras de tejido en monocapas de LLC-MK2, como se ha descrito anteriormente y en Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998, y los títulos se presentan como la media
45 del \log_{10} $DICT_{50}$ /gramo de tejido.

RESULTADOS

Recuperación y caracterización del virus quimérico recombinante rPIV3-1.cp45L

50

- [0204]** Como se ha señalado anteriormente, el clon de ADNc pFLC.2G+.hc, un ADNc antigenómico de longitud completa de PIV3 en el que las ORF que codifican las glicoproteínas F y HN se han sustituido por las de PIV1, se modificó por introducción de tres cambios de codificación de aminoácido (denominados 942, 992 y 1558 de acuerdo con la posición de aminoácido en la proteína L) identificados en el gen de L de cp45 y que se demostró que eran
55 mutaciones ts y atenuantes independientes (Fig. 19; véase también, Skiadopoulos et al., J Virol 72: 1762, 1998). Cada cambio de codificación se marcó mediante la cointroducción de sustituciones de nucleótidos silenciosas en la traducción contiguas, que suprimen un sitio de restricción de origen natural (Fig. 19; Tabla 8). La construcción de plásmido de longitud completa final pFLC.2G+.hc.cp45L (Fig. 19) codifica un ARN antigenómico quimérico de PIV3-1 de 15516 nucleótidos de longitud y se ajusta a la regla de seis (véase, Durbin et al., Virology 234: 74, 1997). La
60 autenticidad del pFLC.2G+.hc.cp45L se confirmó mediante la digestión con enzimas de restricción apropiadas.

[0205] El ADNc de pFLC.2G+.hc.cp45L se transfectó en células HEp-2 junto con los plásmidos de soporte de N, P y L de PIV3, y se infectaron con MVA-T7 como se ha descrito anteriormente y en Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998).

El virus recuperado después de dos pases en células LLC-MK2, denominado rPIV3-1-cp45L, se clonó biológicamente por pase de placa a placa a placa, y el virus amplificado se analizó para confirmar que poseía las glicoproteínas de PIV1 y las tres mutaciones introducidas en L. En primer lugar, la presencia de la proteína HN de PIV1 en rPIV3-1.cp45L se confirmó por reactividad con anticuerpos específicos de PIV1 en un ensayo de HAI como se ha descrito anteriormente y en Tao et al., J Virol 72:2955, 1998. La presencia de los genes de HN y F de PIV3-1 quiméricos, así como las mutaciones del gen de L introducidas en el ARN genómico de rPIV3-1.cp45L, se confirmó por digestión con enzimas de restricción o análisis de la secuencia de nucleótidos de productos de RT-PCR generados a partir de ARN de virión como se ha descrito anteriormente y en Tao et al., J Virol 72: 2955, 1998. Estos datos confirmaron que el rPIV3-1.cp45L es un virus quimérico recombinante que lleva las tres sustituciones de codones del gen L de cp45.

El rPIV3-1.cp45L es termosensible

[0206] Las tres mutaciones del gen de L de cp45 se demostró anteriormente que conferían el fenotipo ts cuando se introducían en PIV3 wt (véase también, Skiadopoulos et al., J Virol 72: 1762, 1998). Para evaluar si su presencia en el virus quimérico tendría el mismo efecto, se determinó la eficacia de la formación de placas de rPIV3-1.cp45L a diversas temperaturas. Como se muestra en la Tabla 15, las tres mutaciones de L conferían de hecho el fenotipo ts al virus quimérico. El nivel de termosensibilidad especificado por las mutaciones de L de cp45 en los virus recombinantes rPIV3cp45L y rPIV3-1.cp45L era equivalente (Tabla 15), indicando que el efecto de las mutaciones es independiente de las glicoproteínas HN y F de PIV3 o PIV1. El nivel de termosensibilidad de rPIV3cp45L y rPIV3-1.cp45L era comparable al del virus cp45 derivado biológicamente, a pesar del hecho de que este último virus posee mutaciones fuera de L (véase, Stokes et al., Virus Res 30: 43, 1993).

Tabla 15. El virus vacunal candidato rPIV3-1.cp45L quimérico recombinante es termosensible

Virus ^a	Título de virus ^b a las temperaturas indicadas (log ₁₀ UFP/ml)					
	32 °C	36 °C	37 °C	38 °C	39 °C	40 °C
rPIV3/JS	7,4	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
PIV1/Wash64 ^c	7,5	7,6	7,5	7,5	7,4	7,2
rPIV3-1	7,5	7,5	7,5	7,2	6,0	6,1
PIV3cp45 ^c	7,4	6,9	6,8	4,7 ^d	<0,7	<0,7
rPIV3cp45L	7,9	7,4	7,7	5,3	1,2	<0,7
rPIV3-1.cp45L	8,1	8,0	8,2	6,1	<0,7	<0,7

^a Nomenclatura de virus: rPIV3/JS, cepa JS de PIV3 wt recombinante; PIV1/Wash64, PIV1 wt derivado biológicamente; rPIV3-1, PIV3 quimérico recombinante en el que las ORF de F y HN se han sustituido con las de PIV1/Wash64; PIV3cp45, virus vacunal candidato cp45 derivado biológicamente; rPIV3cp45L, PIV3 recombinante que contiene las tres mutaciones de gen de L de cp45; rPIV3-1.cp45L, rPIV3-1 quimérico recombinante que contiene las tres mutaciones del gen de L de cp45.

^b Los títulos de virus se determinaron usando monocapas de LLC-MK2 en placas de 12 pocillos. Los títulos eran el promedio de dos ensayos.

^c Virus derivados biológicamente. Todos los demás son virus recombinantes.

^d La temperatura de interrupción, es decir, la temperatura restrictiva más baja a la que se observa una reducción de dos log₁₀ en el título de virus, de cada virus ts se indica en negrita.

Nivel de replicación de rPIV3-1.cp45L en hámsteres

[0207] Las tres mutaciones del gen de L de cp45 se demostró anteriormente que conferían atenuación de la replicación de virus en el tracto respiratorio superior e inferior de hámsteres cuando se introducían en PIV3 wt (véase también, Skiadopoulos et al., J Virol 72: 1762, 1998). Su efecto sobre el virus quimérico se evaluó mediante infección intranasal de hámsteres, como se muestra en la Tabla 16. Estos descubrimientos indican que el rPIV3-1.cp45L estaba de hecho atenuado en ambos sitios y, además, que su nivel de atenuación era comparable al de rPIV3cp45L. Por lo tanto, la capacidad de las mutaciones de L de cp45 para conferir atenuación, como la termosensibilidad, es independiente de la especificidad antigénica de las glicoproteínas de superficie.

Tabla 16. El virus vacunal candidato rPIV3-1.cp45L quimérico recombinante está atenuado en el tracto respiratorio de hámsteres ^a

Virus	Título de virus en el tejido indicado (\log_{10} DICT ₅₀ /g \pm E.E.) ^b	
	Cornetes nasales	Pulmones
rPIV3-1.cp45L	4,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,4
rPIV3-1	6,0 \pm 0,3	6,3 \pm 0,4
rPIV3cp45L	3,0 \pm 0,3	<1,2
rPIV3/JS	5,7 \pm 0,3	5,0 \pm 0,3

^a Se infectaron grupos de cinco hámsteres por vía intranasal con los virus indicados a una dosificación de 10⁶ UFP por hámster. El día 4 post-infección las muestras de tejido se recogieron y se ensayaron para virus.
^b Los títulos de virus se proporcionan como Log₁₀ DICT₅₀ por gramo de tejido.

La infección con rPIV3-1 o rPIV3-1.cp45L, que contienen las proteínas internas de PIV3 y las glicoproteínas de PIV1, confiere resistencia a la exposición a PIV1 en hámsteres.

[0208] El virus rPIV3-1 quimérico y su derivado rPIV3-1.cp45L atenuado se evaluaron para determinar su inmunogenicidad y su eficacia protectora en hámsteres. Como se muestra en la Tabla 17, la infección con cualquier virus inducía anticuerpos de HAI contra PIV1, pero no PIV3, confirmando que estos virus quiméricos poseen la glicoproteína de HN de PIV1 y son altamente inmunogénicos. El nivel de anticuerpos de HAI inducidos por rPIV3-1.cp45L era dos veces menor que el de por rPIV3-1, lo que indica que su atenuación daba como resultado una disminución modesta en la inmunogenicidad. De forma similar, el rPIV3 y el rPIV3cp45L inducían anticuerpos de HAI contra PIV3, pero no contra PIV1, y el nivel inducido por el virus atenuado era aproximadamente dos veces menor. A pesar de la replicación restringida en hámsteres de los virus recombinantes que llevan las mutaciones de L de cp45, la infección con rPIV3cp45L o rPIV3-1.cp45L inducía una resistencia completa a la replicación de virus exposición que lleva glicoproteínas homólogas.

Tabla 17. El virus vacunal candidato rPIV3-1.cp45L quimérico recombinante induce una resistencia completa contra PIV1 y una resistencia parcial contra PIV3 tras la exposición en hámsteres ^a

Virus usado para la inmunización	Origen de las glicoproteínas	Título de HAI post-inmunización (Inversa del $\log_2 \pm$ E.E.)		Título de virus en el tejido indicado ^c (\log_{10} DICT ₅₀ /gramo \pm E.E.)			
		α -PIV1	α -PIV3	Replicación de virus de exposición PIV1		Replicación de virus de exposición PIV3	
				Cornetes nasales	Pulmones	Cornetes nasales	Pulmones
Control ^b	-	≤ 1	≤ 1	5,0 \pm 0,3	4,6 \pm 0,5	5,5 \pm 0,4	5,0 \pm 0,7
rPIV3-1.cp45L	PIV1	6,9 \pm 0,5	≤ 1	$\leq 1,2$	$\leq 1,2$	1,9 \pm 0,6	1,7 \pm 0,5
rPIV3-1	PIV1	7,9 \pm 0,4	≤ 1	$\leq 1,2$	$\leq 1,2$	2,9 \pm 0,3	2,6 \pm 0,4
rPIV3cp45L	PIV3	≤ 1	9,3 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	2,8 \pm 0,7	$\leq 1,2$	$\leq 1,2$
rPIV3/JS	PIV3	≤ 1	10,3 \pm 0,3	4,6 \pm 0,4	2,4 \pm 0,5	$\leq 1,2$	$\leq 1,2$
PIV3p45 ^d	PIV3	≤ 1	8,9 \pm 0,4	4,9 \pm 0,2	2,5 \pm 0,8	$\leq 1,2$	$\leq 1,2$

^a Se inmunizaron grupos de 10 hámsteres por vía intranasal con 10⁶ UFP de los virus indicados. Se recogieron los sueros post-inmunización los días 33, dos días antes de la exposición (véase^c).

^b Los hámsteres en el grupo de control no se inocularon.

^c Cinco semanas después de la inmunización, se expusieron cinco hámsteres de cada grupo por vía intranasal a 10⁶ UFP de virus indicado. Se recogieron muestras de tejido 4 días post-exposición. Los virus presentes en muestras de tejido se titularon en monocapas de LLC-MK2 y los datos se presentan como \log_{10} DICT₅₀/gramo de tejido \pm error estándar.

^d Virus derivado biológicamente.

La infección con rPIV3-1.cp45L también confiere resistencia a PIV3

[0209] La información sobre el papel de las glicoproteínas distintas de HN o F de PIV (es decir, las proteínas internas) en la resistencia es limitada. La descripción y uso de rPIV3-1 y rPIV3-1.cp45L en la presente memoria proporciona una oportunidad para examinar el papel que las proteínas internas desempeñan en la resistencia a la exposición con PIV3, puesto que los únicos genes compartidos por los virus de inmunización y exposición son los genes de las proteínas internas. La replicación de virus de exposición PIV3 estaba significativamente restringida en los tractos respiratorios tanto superior como inferior por una infección previa de hámsteres con rPIV3-1 o rPIV3-1.cp45L (Tabla 17). Por lo tanto, estos datos indican que las proteínas internas de PIV3, como las proteínas HN y F, son capaces de inducir una resistencia parcial a la replicación del PIV3 de exposición.

[0210] Entre los descubrimientos demostrados por los estudios de inmunogenicidad y eficacia anteriores un descubrimiento particularmente inesperado era que la infección con rPIV3 wt o atenuado inducía una reducción de

100 veces en la replicación de virus de exposición PIV1 en los pulmones. Por lo tanto, la infección con un serotipo de PIV proporcionaba una protección significativa contra un serotipo heterólogo. Esto era inesperado en parte porque estudios previos indicaban que la infección de animales con un tipo de PIV humano no inducía una protección heteróloga significativa contra un PIV que pertenece a un serotipo humano diferente, de acuerdo con la
 5 creencia general de que la inmunidad contra infecciones por PIV humano era en gran medida específica de tipo (véase, por ejemplo, Cook et al., Amer. Jour. Hyg. 77: 150, 1963; Ray et al., J. Infect. Dis. 162: 746, 1990).

[0211] El presente Ejemplo demuestra el aprovechamiento con éxito de nuevos métodos y reactivos desarrollados para generar vacunas de PIV3 para proporcionar adicionalmente un desarrollo racional rápido de vacunas
 10 candidatas vivas atenuadas para PIV1. Un ADNc que codifica PIV3 infeccioso se modificó por sustitución de las ORF que codifican los antígenos protectores HN y F de PIV1 en el lugar de sus homólogas de PIV3. Por consiguiente, las mutaciones atenuantes, ejemplificadas por tres mutaciones atenuantes presentes en el gen de L del PIV3 cp45, se incorporaron dentro de este ADNc de PIV3-PIV1 quimérico modificado. A partir de este ADNc se recuperó un virus
 15 recombinante que llevaba los genes de HN y F de PIV1, las proteínas internas de PIV3 y las mutaciones del gen de L de PIV3 cp45. Este rPIV3-1.cp45L recombinante era termosensible, estaba altamente atenuado en hámsteres y era altamente eficaz frente a la exposición a PIV1 en hámsteres. El nivel de termosensibilidad, atenuación e inmunogenicidad presentado por rPIV3-1.cp45L era comparable al de PIV3 cp45, indicando que los fenotipos especificados por el conjunto de mutaciones del gen de L de cp45 eran independientes de las glicoproteínas de superficie HN y F. Estos descubrimientos, que representan el primer candidato a vacuna de PIV1 vivo atenuado
 20 generado por genética inversa, proporcionan un esquema generalmente exitoso para desarrollar vacunas contra PIV1.

[0212] Se conoce escasa información en relación con el papel que las proteínas internas de virus parainfluenza desempeñan en la resistencia a la reinfección con virus homólogo. La infección con recombinantes de vaccinia que
 25 expresan N, epítopos dentro de N o M se ha descrito que induce resistencia contra la replicación de virus de exposición, pero la magnitud de la resistencia descrita es menor que la inducida por recombinantes de vaccinia que llevan las glicoproteínas HN o F (véase, por ejemplo, Kast et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2283, 1991; Sakaguchi et al., J. Gen. Virol. 74: 479, 1993; Thomson et al., J. Immunol. 157: 822, 1996). Estos estudios sugerían que las proteínas internas estaban haciendo sólo contribuciones minoritarias a la resistencia a la reinfección. Por lo
 30 tanto, la presente descripción presenta resultados inesperados mostrando que una infección previa de hámsteres con rPIV3-1.cp45L o rPIV3-1 inducía una reducción de aproximadamente 250 a 4000 veces de la replicación de PIV3 tanto en los cornetes nasales como en los pulmones. Estos dos virus recombinantes quiméricos difieren del virus de exposición PIV3 en el sentido de que poseen las glicoproteínas HN y F de PIV1 en lugar de las de PIV3, pero comparten todos los demás genes con el virus de exposición. Las glicoproteínas HN y F de PIV1 comparten
 35 una identidad de secuencia del 47% y del 43% con las de PIV3, respectivamente. Aunque es probable que las proteínas internas compartidas estén mediando la resistencia observada, también es posible que las secuencias proteicas compartidas entre las glicoproteínas F y HN de PIV1 y PIV3 estén contribuyendo a la inmunidad observada. Por ejemplo, hay 5 extensiones en HN y 2 extensiones en F que abarcan al menos 9 restos aminoacídicos en longitud que están compartidos entre PIV1 y PIV3 y que tienen el potencial de actuar como
 40 epítopos de CTL protectores. Es razonable considerar que las proteínas internas compartidas estén contribuyendo a la restricción de la replicación de virus de exposición PIV3 wt, ya que este nivel de inmunidad cruzada no se ha observado en estudios previos (véase, por ejemplo, Cook et al., Amer. Jour. Hyg. 77: 150, 1963; Ray et al., J. Infect. Dis. 162: 746, 1990).

[0213] El descubrimiento de que las proteínas internas de PIV3 de las quimeras rPIV3-1 y rPIV3-1.cp45L conferían resistencia a la exposición a PIV3 demuestra que pueden usarse derivados atenuados de PIV3 como vectores para
 45 antígenos protectores de PIV1 y PIV2. Siguiendo las enseñanzas de la invención, la inmunización con un virus vacunal vivo atenuado basado en PIV3 puede restringir la replicación de otros virus vacunales basados en PIV3 administrados posteriormente, disminuyendo de este modo la inmunogenicidad del segundo virus. Puesto que PIV3,
 50 como RSV, induce una enfermedad importante en la primera infancia, una vacuna de RSV-PIV3 combinada para usar en lactantes muy pequeños de 2 a 4 semanas de edad es por lo tanto un aspecto importante de la invención (véase, por ejemplo, Collins et al., Fields Virology 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1205 (1), 1996; Reed et al., J. Infect. Dis. 175: 807, 1997). De acuerdo con este aspecto de la invención, la inmunización con una
 55 vacuna de PIV1-PIV2 se iniciará de preferencia aproximadamente a los 6 meses de edad, puesto que la mayoría de las enfermedades por PIV1 y PIV2 aparecen después de la edad de seis meses. En la posible circunstancia de que la inmunización con rPIV3 cp45 inhiba significativamente la replicación de un virus vacunal PIV3-1 recombinante quimérico con el que comparte genes de proteínas internas, la inmunización con éxito con una vacuna PIV3-1 recombinante puede estar comprometida. En este caso, se administrará una vacuna de PIV trivalente simultáneamente, más que secuencialmente, previniendo de este modo la inhibición señalada anteriormente.

[0214] La descripción en la presente memoria de que la infección con una vacuna o PIV3 wt induciría una
 60 reducción de 100 veces de la replicación de virus pulmonar del PIV1 wt heterólogo era claramente inesperada, en parte porque los virus PIV humanos son serológicamente distintos por ensayo de neutralización, y estudios previos

en hámsteres descubrieron que una infección previa con un tipo de PIV no inducía resistencia a la exposición con una alta dosis de un tipo de PIV diferente (véase, por ejemplo, Cook et al., Amer. Jour. Hyg. 77: 150, 1963; Ray et al., J. Infect. Dis. 162: 746, 1990; Cook et al., Amer. Jour. Hyg. 69:250, 1959). Además, hay pocos datos epidemiológicos que documenten que una infección previa con un PIV modifique significativamente una infección posterior con un PIV heterotípico.

[0215] En resumen, el presente Ejemplo muestra que el rPIV3 se convertía con éxito en una vacuna para PIV1 por sustitución de las ORF que codifican las glicoproteínas F y HN e introducción de mutaciones atenuantes conocidas en los genes internos de PIV3. Por lo tanto, los amplios métodos y reactivos proporcionados en la presente memoria pueden aplicarse directamente y de forma predecible para atenuar la cadena principal de PIV3 del virus quimérico rPIV3-1, así como para generar virus vacunales PIV2 vivos atenuados.

[0216] La descripción anterior hace posible aprovechar los reactivos y métodos proporcionados en la presente memoria para desarrollar una amplia colección de PIV y vacunas relacionadas. En este contexto, la recuperación de quimeras inmunogénicas vivas entre PIV3 y PIV2 ejemplifica nuevas herramientas poderosas para desarrollar una variedad de virus PIV recombinantes para uso vacunal. Junto con este trabajo, la identificación y caracterización de la base genética para la atenuación de mutantes de PIV de origen natural, por ejemplo, los candidatos a vacunas de cp45 y BPIV3, siguiendo las enseñanzas de la presente descripción, también permiten el desarrollo de una gran multitud de virus y partículas subvirales de vacunas recombinantes. En particular, las mutaciones deseadas presentes en virus mutantes derivados biológicamente se identificarán fácilmente y se seleccionarán para su introducción, individualmente o en combinación, en un fondo de PIV de tipo silvestre, parcialmente atenuado o quimérico, como se muestra en los Ejemplos anteriores. Estos descubrimientos ampliarán el menú de mutaciones atenuantes ejemplares dentro de la invención que pueden introducirse en clones de PIV para calibrar el nivel de atenuación e inmunogenicidad en recombinantes vacunales. También pueden introducirse mutaciones biológicamente en desventaja dentro de clones de PIV que tengan diferentes tipos de mutaciones, por ejemplo, mutaciones que impliquen alteraciones, deleciones o sustituciones de un gen o segmento génico. Dentro de este aspecto de la invención, se proporcionan PIV recombinantes que tienen una delección, adición o sustitución génica seleccionada, tal como un rPIV que tiene una delección de una o varias ORF C, D o V. Dichos clones mutados alternativamente pueden modificarse adicionalmente de acuerdo con la presente descripción por introducción de una o más mutaciones que especifiquen un fenotipo *ts*, *ca* o *att* adoptado de un PIV mutante derivado biológicamente, como se ejemplifica por los recombinantes de PIV r942, r992, r1558, r942/992, r992/1558 o r942/1558 y r942/992/1558. En aspectos adicionales de la invención, se combinarán mutaciones derivadas biológicamente con las mutaciones atenuantes *de novo* no encontradas en la naturaleza, como se ejemplifica por deleciones génicas atenuantes, por ejemplo, de una o varias ORF C, D y/o V. Otros tipos de mutaciones descritas en la presente memoria que confieren características fenotípicas deseadas también se combinarán con mutaciones atenuantes biológicamente derivadas similares a la variedad de mutaciones combinatorias descritas para cepas vacunales de RSV recombinantes en la Solicitud de Patente de Estados Unidos de N° de Serie 08/892.403, presentada el 15 de julio de 1997. Pueden introducirse fácilmente mutaciones comparables, por ejemplo, en un virus quimérico, para conseguir los niveles deseados de atenuación e inmunogenicidad en una cepa vacunal quimérica. De esta forma, se proporciona un amplio menú de mutaciones dentro de la invención, que son útiles para modificar por ingeniería genética una amplia colección de vacunas de rPIV vivas atenuadas que tienen un equilibrio deseado de atenuación e inmunogenicidad, junto con otras características fenotípicas deseadas.

[0217] Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con el fin de la claridad de comprensión, será evidente que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

[0218]

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

55

(A) NOMBRE: El Gobierno de los Estados Unidos

(B) CALLE: Box OTT

(C) CIUDAD: Bethesda

(D) ESTADO: Maryland

60

(E) PAÍS: Estados Unidos de América

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20892

(G) TELÉFONO:

(H) TELEFAX:

(I) TELEX:

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE VIRUS PARAINFLUENZA ATENUADO A PARTIR DE UNA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CLONADA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 74

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: WO
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 22-MAYO-1998
- (C) CLASIFICACIÓN:

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/059.385
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23-MAYO-1997

(vii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: King, Jeffrey J.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 38.515
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 17634-000320PC

(viii) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELÉFONO: 206-467-9600
- (B) TELEFAX: 415-575-0300

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15669 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 1:

GCTGGGTACC GGGCCCGTCG ACGCGTATAT AGTTCTCTCT TTCAGCAAAA AACCCCTCAA 60
GAGCCGTTTA GAGGCCCCAA GGGGTTATGC TACTGCAGGC TCTCCCTTAG CCATCCGAGT 120

GGACGTGCGT	CCTCCTTCGG	ATGCCCAGGT	CGGACCGCGA	GGAGGTGGAG	ATGCCATGCC	180
GACCCACCAA	ACAAGAGAAG	AAACTTGTCT	GGGAATATAA	ATTTAACTTT	AAATTAACCTT	240
AGGATTAAAG	ACATTGACTA	GAAGGTCAAG	AAAAGGGAAC	TCTATAATTT	CAAAAATGTT	300
GAGCCTATTT	GATACATTTA	ATGCACGTAG	GCAAGAAAAC	ATAACAAAAT	CAGCCGGTGG	360
AGCTATCATT	CCTGGACAGA	AAAATACTGT	CTCTATATTC	GCCCTTGGAC	CGACAATAAC	420
TGATGATAAT	GAGAAAATGA	CATTAGCTCT	TCTATTTCTA	TCTCATTCAC	TAGATAATGA	480
GAAACAACAT	GCACAAAGGG	CAGGGTCTCT	GGTGTCTTTA	TTGTCAATGG	CTTATGCCAA	540
TCCAGAGCTC	TACCTAACAA	CAAATGGAAG	TAATGCAGAT	GTCAAGTATG	TCATATACAT	600
GATTGAGAAA	GATCTAAAAC	GGCAAAAGTA	TGGAGGATTT	GTGGTTAAGA	CGAGAGAGAT	660
GATATATGAA	AAGACAACTG	ATTGGATATT	TGGAAGTGAC	CTGGATTATG	ATCAGGAAAC	720
TATGTTGCAG	AACGGCAGGA	ACAATTCAAC	AATTGAAGAC	CTTGTCACAC	CATTTGGGTA	780
TCCATCATGT	TTAGGAGCTC	TTATAATACA	GATCTGGATA	GTTCTGGTCA	AAGCTATCAC	840
TAGTATCTCA	GGGTTAAGAA	AAGGCTTTTT	CACCCGATTG	GAAGCTTTCA	GACAAGATGG	900
AACAGTGCAG	GCAGGGCTGG	TATTGAGCGG	TGACACAGTG	GATCAGATTG	GGTCAATCAT	960
GCGGTCTCAA	CAGAGCTTGG	TAACTCTTAT	GGTTGAAACA	TTAATAACAA	TGAATACCAG	1020
CAGAAATGAC	CTCACAACCA	TAGAAAAGAA	TATACAAATT	GTTGGCAACT	ACATAAGAGA	1080
TGCAGGTCTC	GCTTCATTCT	TCAATACAAT	CAGATATGGA	ATTGAGACCA	GAATGGCAGC	1140
TTTGACTCTA	TCCACTCTCA	GACCAGATAT	CAATAGATTA	AAAGCTTTGA	TGGAAGTGTA	1200
TTTATCAAAG	GGACCACGCG	CTCCTTTTCAT	CTGTATCCTC	AGAGATCCTA	TACATGGTGA	1260
GTTCGCACCA	GGCAACTATC	CTGCCATATG	GAGCTATGCA	ATGGGGGTGG	CAGTTGTACA	1320
AAATAGAGCC	ATGCAACAGT	ATGTGACGGG	AAGATCATAT	CTAGACATTG	ATATGTTCCA	1380
GCTAGGACAA	GCAGTAGCAC	GTGATGCCGA	AGCTCAAATG	AGCTCAACAC	TGGAAGATGA	1440
ACTTGGAGTG	ACACACGAAT	CTAAAGAAAG	CTTGAAGAGA	CATATAAGGA	ACATAAACAG	1500
TTCAGAGACA	TCTTTCCACA	AACCGACAGG	TGGATCAGCC	ATAGAGATGG	CAATAGATGA	1560
AGAGCCAGAA	CAATTGGAAC	ATAGAGCAGA	TCAAGAACAA	AATGGAGAAC	CTCAATCATC	1620
CATAATTCAA	TATGCCCTGGG	CAGAAGGAAA	TAGAAGCGAT	GATCAGACTG	AGCAAGCTAC	1680
AGAATCTGAC	AATATCAAGA	CCGAACAACA	AAACATCAGA	GACAGACTAA	ACAAGAGACT	1740
CAACGACAAG	AAGAAACAAA	GCAGTCAACC	ACCCACTAAT	CCCACAAACA	GAACAAACCA	1800
GGACGAAATA	GATGATCTGT	TTAACGCATT	TGGAAGCAAC	TAATCGAATC	AACATTTTAA	1860
TCTAAATCAA	TAATAAATAA	GAAAAACTTA	GGATTAAAGA	ATCCTATCAT	ACCGGAATAT	1920
AGGGTGGTAA	ATTTAGAGTC	TGCTTGAAAC	TCAATCAATA	GAGAGTTGAT	GGAAAGCGAT	1980
GCTAAAAACT	ATCAAATCAT	GGATTCTTGG	GAAGAGGAAT	CAAGAGATAA	ATCAACTAAT	2040
ATCTCCTCGG	CCCTCAACAT	CATTGAATTC	ATACTCAGCA	CCGACCCCCA	AGAAGACTTA	2100
TCGGAAAACG	ACACAATCAA	CACAAGAACC	CAGCAACTCA	GTGCCACCAT	CTGTCAACCA	2160
GAAATCAAAC	CAACAGAAAC	AAGTGAGAAA	GATAGTGGAT	CAACTGACAA	AAATAGACAG	2220

TCTGGGTCAT	CACACGAATG	TACAACAGAA	GCAAAAGATA	GAAATATTGA	TCAGGAAACT	2280
GTACAGAGAG	GACCTGGGAG	AAGAAGCAGC	TCAGATAGTA	GAGCTGAGAC	TGTGGTCTCT	2340
GGAGGAATCC	CCAGAAGCAT	CACAGATTCT	AAAAATGGAA	CCCAAAACAC	GGAGGATATT	2400
GATCTCAATG	AAATTAGAAA	GATGGATAAG	GACTCTATTG	AGGGGAAAAT	GCGACAATCT	2460
GCAAATGTTC	CAAGCGAGAT	ATCAGGAAGT	GATGACATAT	TTACAACAGA	ACAAAGTAGA	2520
AACAGTGATC	ATGGAAGAAG	CCTGGAATCT	ATCAGTACAC	CTGATACAAG	ATCAATAAGT	2580
GTTGTTACTG	CTGCAACACC	AGATGATGAA	GAAGAAATAC	TAATGAAAAA	TAGTAGGACA	2640
AAGAAAAGTT	CTTCAACACA	TCAAGAAGAT	GACAAAAGAA	TTAAAAAGG	GGGAAAAGGG	2700
AAAGACTGGT	TTAAGAAATC	AAAAGATACC	GACAACCAGA	TACCAACATC	AGACTACAGA	2760
TCCACATCAA	AAGGGCAGAA	GAAAATCTCA	AAGACAACAA	CCACCAACAC	CGACACAAAG	2820
GGGCAAACAG	AAATACAGAC	AGAATCATCA	GAAACACAAT	CCTCATCATG	GAATCTCATC	2880
ATCGACAACA	ACACCGACCG	GAACGAACAG	ACAAGCACAA	CTCCTCCAAC	AACAACCTCC	2940
AGATCAACTT	ATACAAAAGA	ATCGATCCGA	ACAAACTCTG	AATCCAAACC	CAAGACACAA	3000
AAGACAAATG	GAAAGGAAAG	GAAGGATACA	GAAGAGAGCA	ATCGATTTAC	AGAGAGGGCA	3060
ATTACTCTAT	TGCAGAATCT	TGGTGTAATT	CAATCCACAT	CAAACTAGA	TTTATATCAA	3120
GACAAACGAG	TTGTATGTGT	AGCAAATGTA	CTAAACAATG	TAGATACTGC	ATCAAAGATA	3180
GATTTCTGG	CAGGATTAGT	CATAGGGGTT	TCAATGGACA	ACGACACAAA	ATTAACACAG	3240
ATACAAAATG	AAATGCTAAA	CCTCAAAGCA	GATCTAAAGA	AAATGGACGA	ATCACATAGA	3300
AGATTGATAG	AAAATCAAAG	AGAACAACCTG	TCATTGATCA	CGTCACTAAT	TTCAAATCTC	3360
AAAATTATGA	CTGAGAGAGG	AGGAAAGAAA	GACCAAATG	AATCCAATGA	GAGAGTATCC	3420
ATGATCAAAA	CAAAATTGAA	AGAAGAAAAG	ATCAAGAAGA	CCAGGTTTGA	CCCCTTATG	3480
GAGGCACAAG	GCATTGACAA	GAATATACCC	GATCTATATC	GACATGCAGG	AGATACACTA	3540
GAGAACGATG	TACAAGTTAA	ATCAGAGATA	TTAAGTTCAT	ACAATGAGTC	AAATGCAACA	3600
AGACTAATAC	CCAAAAAAGT	GAGCAGTACA	ATGAGATCAC	TAGTTGCAGT	CATCAACAAC	3660
AGCAATCTCT	CACAAAGCAC	AAAACAATCA	TACATAAACG	AACTCAAACG	TTGCAAAAAT	3720
GATGAAGAAG	TATCTGAATT	AATGGACATG	TTCAATGAAG	ATGTCAACAA	TTGCCAATGA	3780
TCCAACAAAG	AAACGACACC	GAACAAACAG	ACAAGAAACA	ACAGTAGATC	AAAACCTGTC	3840
AACACACACA	AAATCAAGCA	GAATGAAACA	ACAGATATCA	ATCAATATAC	AAATAAGAAA	3900
AACTTAGGAT	TAAAGAATAA	ATTAATCCTT	GTCCAAAATG	AGTATAACTA	ACTCTGCAAT	3960
ATACACATTC	CCAGAATCAT	CATTCTCTGA	AAATGGTCAT	ATAGAACCAT	TACCACTCAA	4020
AGTCAATGAA	CAGAGGAAAG	CAGTACCCCA	CATTAGAGTT	GCCAAGATCG	GAAATCCACC	4080
AAAACACGGA	TCCCGGTATT	TAGATGTCTT	CTTACTCGGC	TTCTTCGAGA	TGGAACGAAT	4140
CAAAGACAAA	TACGGGAGTG	TGAATGATCT	CGACAGTGAC	CCGAGTTACA	AAGTTTGTGG	4200
CTCTGGATCA	TTACCAATCG	GATTGGCTAA	GTACACTGGG	AATGACCAGG	AATTGTTACA	4260
AGCCGCAACC	AAACTGGATA	TAGAAGTGAG	AAGAACAGTC	AAGCGAAAG	AGATGGTTGT	4320

TTACACGGTA	CAAAATATAA	AACCAGAACT	GTACCCATGG	TCCAATAGAC	TAAGAAAAGG	4380
AATGCTGTTT	GATGCCAACA	AAGTTGCTCT	TGCTCCTCAA	TGTCTTCCAC	TAGATAGGAG	4440
CATAAAATTT	AGAGTAATCT	TCGTGAATTG	TACGGCAATT	GGATCAATAA	CCTTGTTCAA	4500
AATTCCTAAG	TCAATGGCAT	CACTATCTCT	ACCCAACACA	ATATCAATCA	ATCTGCAGGT	4560
ACACATAAAA	ACAGGGGTTT	AGACTGATTC	TAAAGGGATA	GTTCAAATTT	TGGATGAGAA	4620
AGGCGAAAAA	TCACTGAATT	TCATGGTCCA	TCTCGGATTG	ATCAAAAAGAA	AAGTAGGCAG	4680
AATGTACTCT	GTTGAATACT	GTAAACAGAA	AATCGAGAAA	ATGAGATTGA	TATTTTCTTT	4740
AGGACTAGTT	GGAGGAATCA	GTCTTCATGT	CAATGCAACT	GGGTCCATAT	CAAAAACACT	4800
AGCAAGTCAG	CTGGTATTCA	AAAGAGAGAT	TTGTTATCCT	TTAATGGATC	TAAATCCGCA	4860
TCTCAATCTA	GTTATCTGGG	CTTCATCAGT	AGAGATTACA	AGAGTGGATG	CAATTTTCCA	4920
ACCTTCTTTA	CCTGGCGAGT	TCAGATACTA	TCCTAATATT	ATTGCAAAAG	GAGTTGGGAA	4980
AATCAAACAA	TGGAAGTAGT	AATCTCTATT	TTAGTCCGGA	CGTATCTATT	AAGCCGAAGC	5040
AAATAAAGGA	TAATCAAAAA	CTTAGGACAA	AAGAGGTCAA	TACCAACAAC	TATTAGCAGT	5100
CACACTCGCA	AGAATAAGAG	AGAAGGGACC	AAAAAAGTCA	AATAGGAGAA	ATCAAAACAA	5160
AAGGTACAGA	ACACCAGAAC	AACAAAATCA	AAACATCCAA	CTCACTCAAA	ACAAAAATTC	5220
CAAAAGAGAC	CGGCAACACA	ACAAGCACTG	AACACAATGC	CAACTTCAAT	ACTGCTAATT	5280
ATTACAACCA	TGATCATGGC	ATCTTTCTGC	CAAATAGATA	TCACAAAAC	ACAGCACGTA	5340
GGTGTATTGG	TCAACAGTCC	CAAAGGGATG	AAGATATCAC	AAAACTTTGA	AACAAGATAT	5400
CTAATTTTGA	GCCTCATACC	AAAAATAGAA	GACTCTAACT	CTTGTGGTGA	CCAACAGATC	5460
AAGCAATACA	AGAAGTTATT	GGATAGACTG	ATCATCCCTT	TATATGATGG	ATTAAGATTA	5520
CAGAAAGATG	TGATAGTAAC	CAATCAAGAA	TCCAATGAAA	ACACTGATCC	CAGAACAAAA	5580
CGATTCTTTG	GAGGGGTAAT	TGGAACCATT	GCTCTGGGAG	TAGCAACCTC	AGCACAAATT	5640
ACAGCGGCAG	TTGCTCTGGT	TGAAGCCAAG	CAGGCAAGAT	CAGACATCGA	AAAACTCAAA	5700
GAAGCAATTA	GGGACACAAA	CAAAGCAGTG	CAGTCAGTTC	AGAGCTCCAT	AGGAAATTTA	5760
ATAGTAGCAA	TTAAATCAGT	CCAGGATTAT	GTTAACAAAG	AAATCGTGCC	ATCGATTGCG	5820
AGGCTAGGTT	GTGAAGCAGC	AGGACTTCAA	TTAGGAATTG	CATTAACACA	GCATTACTCA	5880
GAATTAACAA	ACATATTTGG	TGATAACATA	GGATCGTTAC	AAGAAAAAGG	AATAAAATTA	5940
CAAGGTATAG	CATCATTATA	CCGCACAAAT	ATCACAGAAA	TATTCACAAC	ATCAACAGTT	6000
GATAAATATG	ATATCTATGA	TCTGTTATTT	ACAGAATCAA	TAAAGGTGAG	AGTTATAGAT	6060
GTTGACTTGA	ATGATTACTC	AATCACCCCTC	CAAGTCAGAC	TCCCTTTATT	AACTAGGCTG	6120
CTGAACACTC	AGATCTACAA	AGTAGATTCC	ATATCATATA	ACATCCAAAA	CAGAGAATGG	6180
TATATCCCTC	TTCCAGCCA	TATCATGACG	AAAGGGGCAT	TTCTAGGTGG	AGCAGACGTC	6240
AAAGAATGTA	TAGAAGCATT	CAGCAGCTAT	ATATGCCCTT	CTGATCCAGG	ATTTGTATTA	6300
AACCATGAAA	TAGAGAGCTG	CTTATCAGGA	AACATATCCC	AATGTCCAAG	AACAACGGTC	6360
ACATCAGACA	TTGTTCCAAG	ATATGCATTT	GTCAATGGAG	GAGTGGTTGC	AAACTGTATA	6420

ACAACCACCT GTACATGCAA CGGAATTGGT AATAGAATCA ATCAACCACC TGATCAAGGA	6480
GTAAAAATTA TAACACATAA AGAATGTAGT ACAATAGGTA TCAACGGAAT GCTGTTCAAT	6540
ACAAATAAAG AAGGAACTCT TGCATTCTAT ACACCAAATG ATATAACACT AAACAATTCT	6600
GTTGCACTTG ATCCAATTGA CATATCAATC GAGCTCAACA AGGCCAAATC AGATCTAGAA	6660
GAATCAAAAG AATGGATAAG AAGGTCAAAT CAAAACTAG ATTCTATTGG AAATTGGCAT	6720
CAATCTAGCA CTACAATCAT AATTATTTTG ATAATGATCA TTATATTGTT TATAATTAAT	6780
ATAACGATAA TTACAATTGC AATTAAGTAT TACAGAATTC AAAAGAGAAA TCGAGTGGAT	6840
CAAAATGACA AGCCATATGT ACTAACAAAC AAATAACATA TCTACAGATC ATTAGATATT	6900
AAAATTATAA AAAACTTAGG AGTAAAGTTA CGCAATCCAA CTCTACTCAT ATAATTGAGG	6960
AAGGACCCAA TAGACAAATC CAAATTCGAG ATGGAATACT GGAAGCATAC CAATCACGGA	7020
AAGGATGCTG GTAATGAGCT GGAGACGTCT ATGGCTACTC ATGGCAACAA GCTCACTAAT	7080
AAGATAATAT ACATATTATG GACAATAATC CTGGTGTTAT TATCAATAGT CTTCATCATA	7140
GTGCTAATTA ATTCCATCAA AAGTGAAAAG GCCCACGAAT CATTGCTGCA AGACATAAAT	7200
AATGAGTTTA TGGAAATTAC AGAAAAGATC CAAATGGCAT CGGATAATAC CAATGATCTA	7260
ATACAGTCAG GAGTGAATAC AAGGCTTCTT ACAATTCAGA GTCATGTCCA GAATTACATA	7320
CCAATATCAT TGACACAACA GATGTCAGAT CTTAGGAAAT TCATTAGTGA AATTACAATT	7380
AGAAATGATA ATCAAGAAGT GCTGCCACAA AGAATAACAC ATGATGTAGG TATAAAACCT	7440
TTAAATCCAG ATGATTTTGT GAGATGCACG TCTGGTCTTC CATCTTTAAT GAAAACCTCA	7500
AAAATAAGGT TAATGCCAGG GCCGGGATTA TTAGCTATGC CAACGACTGT TGATGGCTGT	7560
GTTAGAACTC CGTCTTTAGT TATAAATGAT CTGATTTATG CTTATACCTC AAATCTAATT	7620
ACTCGAGGTT GTCAGGATAT AGGAAAATCA TATCAAGTCT TACAGATAGG GATAATAACT	7680
GTAAACTCAG ACTTGGTACC TGACTTAAAT CCTAGGATCT CTCATACCTT TAACATAAAT	7740
GACAATAGGA AGTCATGTTC TCTAGCACTC CTAAATATAG ATGTATATCA ACTGTGTTC	7800
ACTCCCAAAG TTGATGAAAG ATCAGATTAT GCATCATCAG GCATAGAAGA TATTGTACTT	7860
GATATTGTCA ATTATGATGG TTCAATCTCA ACAACAAGAT TTAAGAATAA TAACATAAGC	7920
TTTGATCAAC CATATGCTGC ACTATACCCA TCTGTTGGAC CAGGGATATA CTACAAAGGC	7980
AAAATAATAT TTCTCGGGTA TGGAGGTCTT GAACATCCAA TAAATGAGAA TGTAATCTGC	8040
AACACAACCTG GGTGCCCCGG GAAAACACAG AGAGACTGTA ATCAAGCATC TCATAGTACT	8100
TGGTTTTTCAG ATAGGAGGAT GGTCAACTCC ATCATTGTTG TTGACAAAGG CTTAAACTCA	8160
ATTCCAAAAT TGAAAGTATG GACGATATCT ATGCGACAAA ATTACTGGGG GTCAGAAGGA	8220
AGGTTACTTC TACTAGGTAA CAAGATCTAT ATATATACAA GATCTACAAG TTGGCATAGC	8280
AAGTTACAAT TAGGAATAAT TGATATTACT GATTACAGTG ATATAAGGAT AAAATGGACA	8340
TGGCATAATG TGCTATCAAG ACCAGGAAAC AATGAATGTC CATGGGGACA TTCATGTCCA	8400
GATGGATGTA TAACAGGAGT ATATACTGAT GCATATCCAC TCAATCCAC AGGGAGCATT	8460
GTGTCATCTG TCATATTAGA CTCACAAAAA TCGAGAGTGA ACCCAGTCAT AACTTACTCA	8520

ACAGCAACCG AAAGAGTAAA CGAGCTGGCC ATCCTAAACA GAACACTCTC AGCTGGATAT	8580
ACAACAACAA GCTGCATTAC ACACTATAAC AAAGGATATT GTTTTCATAT AGTAGAAATA	8640
AATCATAAAA GCTTAAACAC ATTTCAACCC ATGTTGTTCA AAACAGAGAT TCCAAAAAGC	8700
TGCAGTTAAT CATAATTAAC CATAATATGC ATCAATCTAT CTATAATACA AGTATATGAT	8760
AAGTAATCAG CAATCAGACA ATAGACAAAA GGGAAATATA AAAAAGCTTAG GAGCAAAGCG	8820
TGCTCGGGAA ATGGACACTG AATCTAACAA TGGCACTGTA TCTGACATAC TCTATCCTGA	8880
GTGTCACCTT AACTCTCCTA TCGTTAAAGG TAAAATAGCA CAATTACACA CTATTATGAG	8940
TCTACCTCAG CCTTATGATA TGGATGACGA CTCAATACTA GTTATCACTA GACAGAAAAAT	9000
AAAACTTAAT AAATTGGATA AAAGACAACG ATCTATTAGA AGATTAAAAAT TAATATTAAC	9060
TGAAAAAGTG AATGACTTAG GAAAATACAC ATTTATCAGA TATCCAGAAA TGTCAAAAGA	9120
AATGTTCAAA TTATATATAC CTGGTATTAA CAGTAAAGTG ACTGAATTAT TACTTAAAGC	9180
AGATAGAACA TATAGTCAAA TGACTGATGG ATTAAGAGAT CTATGGATTA ATGTGCTATC	9240
AAAATTAGCC TCAAAAAATG ATGGAAGCAA TTATGATCTT AATGAAGAAA TTAATAATAT	9300
ATCGAAAGTT CACACAACCT ATAAATCAGA TAAATGGTAT AATCCATTCA AAACATGGTT	9360
TACTATCAAG TATGATATGA GAAGATTACA AAAAGCTCGA AATGAGATCA CTTTTAATGT	9420
TGGGAAGGAT TATAACTTGT TAGAAGACCA GAAGAATTTT TTATTGATAC ATCCAGAATT	9480
GGTTTTGATA TTAGATAAAC AAAACTATAA TGGTTATCTA ATTACTCCTG AATTAGTATT	9540
GATGTATTGT GACGTAGTCG AAGGCCGATG GAATATAAGT GCATGTGCTA AGTTAGATCC	9600
AAAATTACAA TCTATGTATC AGAAAGGTAA TAACCTGTGG GAAGTGATAG ATAAATTGTT	9660
TCCAATTATG GGAGAAAAGA CATTTGATGT GATATCGTTA TTAGAACCAC TTGCATTATC	9720
CTTAATTCAA ACTCATGATC CTGTTAAACA ACTAAGAGGA GCTTTTTTAA ATCATGTGTT	9780
ATCCGAGATG GAATTAATAT TTGAATCTAG AGAATCGATT AAGGAATTTT TGAGTGTAGA	9840
TTACATTGAT AAAATTTTAG ATATATTTAA TAAGTCTACA ATAGATGAAA TAGCAGAGAT	9900
TTTCTCTTTT TTTAGAACAT TTGGGCATCC TCCATTAGAA GCTAGTATTG CAGCAGAAAA	9960
GGTTAGAAAA TATATGTATA TTGGAAAACA ATTAAAATTT GACACTATTA ATAAATGTCA	10020
TGCTATCTTC TGTACAATAA TAATTAACGG ATATAGAGAG AGGCATGGTG GACAGTGGCC	10080
TCCTGTGACA TTACCTGATC ATGCACACGA ATTCATCATA AATGCTTACG GTTCAAAGTC	10140
TGCGATATCA TATGAAAATG CTGTTGATTA TTACCAGAGC TTTATAGGAA TAAAATTCAA	10200
TAAATTCATA GAGCCTCAGT TAGATGAGGA TTTGACAATT TATATGAAAG ATAAAGCATT	10260
ATCTCCAAAA AAATCAAATT GGGACACAGT TTATCCTGCA TCTAATTTAC TGTACCGTAC	10320
TAACGCATCC AACGAATCAC GAAGATTAGT TGAAGTATTT ATAGCAGATA GTAAATTTGA	10380
TCCTCATCAG ATATTGGATT ATGTAGAATC TGGGGACTGG TTAGATGATC CAGAATTTAA	10440
TATTTCTTAT AGTCTTAAAG AAAAGAGAT CAAACAGGAA GGTAGACTCT TTGCAAAAAT	10500
GACATACAAA ATGAGAGCTA CACAAGTTTT ATCAGAGACC CTACTTGCAA ATAACATAGG	10560
AAAATTCCTT CAAGAAAATG GGATGGTGAA GGGAGAGATT GAATTACTTA AGAGATTAAC	10620

AACCATATCA	ATATCAGGAG	TTCCACGGTA	TAATGAAGTG	TACAATAATT	CTAAAAGCCA	10680
TACAGATGAC	CTTAAACCT	ACAATAAAAT	AAGTAATCTT	AATTTGTCTT	CTAATCAGAA	10740
ATCAAAGAAA	TTTGAATTCA	AGTCAACGGA	TATCTACAAT	GATGGATACG	AGACTGTGAG	10800
CTGTTTCCTA	ACAACAGATC	TCAAAAAATA	CTGTCTTAAT	TGGAGATATG	AATCAACAGC	10860
TCTATTTGGA	GAAACTTGCA	ACCAAATATT	TGGATTAAAT	AAATTGTTTA	ATTGGTTACA	10920
CCCTCGTCTT	GAAGGAAGTA	CAATCTATGT	AGGTGATCCT	TACTGTCCTC	CATCAGATAA	10980
AGAACATATA	TCATTAGAGG	ATCACCTGA	TTCTGGTTTT	TACGTTTATA	ACCCAAGAGG	11040
GGGTATAGAA	GGATTTTGTC	AAAAATTATG	GACACTCATA	TCTATAAGTG	CAATACATCT	11100
AGCAGCTGTT	AGAATAGGCG	TGAGGGTGAC	TGCAATGGTT	CAAGGAGACA	ATCAAGCTAT	11160
AGCTGTAACC	ACAAGAGTAC	CCAACAATTA	TGACTACAGA	GTTAAGAAGG	AGATAGTTTA	11220
TAAAGATGTA	GTGAGATTTT	TTGATTCATT	AAGAGAAGTG	ATGGATGATC	TAGGTCATGA	11280
ACTTAAATTA	AATGAAACGA	TTATAAGTAG	CAAGATGTTT	ATATATAGCA	AAAGAATCTA	11340
TTATGATGGG	AGAATTCTTC	CTCAAGCTCT	AAAAGCATT	TCTAGATGTG	TCTTCTGGTC	11400
AGAGACAGTA	ATAGACGAAA	CAAGATCAGC	ATCTTCAAAT	TTGGCAACAT	CATTTGCAAA	11460
AGCAATTGAG	AATGGTTATT	CACCTGTTCT	AGGATATGCA	TGCTCAATTT	TTAAGAATAT	11520
TCAACAACCTA	TATATTGCCC	TTGGGATGAA	TATCAATCCA	ACTATAACAC	AGAATATCAG	11580
AGATCAGTAT	TTTAGGAATC	CAAATTGGAT	GCAATATGCC	TCTTTAATAC	CTGCTAGTGT	11640
TGGGGGATT	AATTACATGG	CCATGTCAAG	ATGTTTTGTA	AGGAATATTG	GTGATCCATC	11700
AGTTGCCGCA	TTGGCTGATA	TTAAAAGATT	TATTAAGGCG	AATCTATTAG	ACCGAAGTGT	11760
TCTTTATAGG	ATTATGAATC	AAGAACCAGG	TGAGTCATCT	TTTTTGGAAT	GGGCTTCAGA	11820
TCCATATTCA	TGCAATTTAC	CACAATCTCA	AAATATAACC	ACCATGATAA	AAAATATAAC	11880
AGCAAGGAAT	GTATTACAAG	ATTCACCAAA	TCCATTATTA	TCTGGATTAT	TCACAAATAC	11940
AATGATAGAA	GAAGATGAAG	AATTAGCTGA	GTTCTTGATG	GACAGGAAGG	TAATTCTCCC	12000
TAGAGTTGCA	CATGATATTC	TAGATAATTC	TCTCACAGGA	ATTAGAAATG	CCATAGCTGG	12060
AATGTTAGAT	ACGACAAAAT	CACTAATTCG	GGTTGGCATA	AATAGAGGAG	GACTGACATA	12120
TAGTTTGTG	AGGAAAATCA	GTAATTACGA	TCTAGTACAA	TATGAAACAC	TAAGTAGGAC	12180
TTTGCGACTA	ATTGTAAGTG	ATAAAATCAA	GTATGAAGAT	ATGTGTTTCG	TAGACCTTGC	12240
CATAGCATTG	CGACAAAAGA	TGTGGATTCA	TTTATCAGGA	GGAAGGATGA	TAAGTGGACT	12300
TGAAACGCCT	GACCCATTAG	AATTACTATC	TGGGGTAGTA	ATAACAGGAT	CAGAACATTG	12360
TAAAATATGT	TATCTTTCAG	ATGGCACAAA	CCCATATACT	TGGATGTATT	TACCCGGTAA	12420
TATCAAAAATA	GGATCAGCAG	AAACAGGTAT	ATCGTCATTA	AGAGTTCCTT	ATTTTGGATC	12480
AGTCACTGAT	GAAAGATCTG	AAGCACAATT	AGGATATATC	AAGAATCTTA	GTAAACCTGC	12540
AAAAGCCGCA	ATAAGAATAG	CAATGATATA	TACATGGGCA	TTTGGTAATG	ATGAGATATC	12600
TTGGATGGAA	GCCTCACAGA	TAGCACAAAC	ACGTGCAAAAT	TTTACACTAG	ATAGTCTCAA	12660
AATTTTAAACA	CCGGTAGCTA	CATCAACAAA	TTTATCACAC	AGATTAAAGG	ATACTGCAAC	12720

TCAGATGAAA	TTCTCCAGTA	CATCATTGAT	CAGAGTCAGC	AGATTCATAA	CAATGTCCAA	12780
TGATAACATG	TCTATCAAAG	AAGCTAATGA	AACCAAAGAT	ACTAATCTTA	TTTATCAACA	12840
AATAATGTTA	ACAGGATTAA	GTGTTTTCGA	ATATTTATTT	AGATTAAAAG	AAACCACAGG	12900
ACACAACCCCT	ATAGTTATGC	ATCTGCACAT	AGAAGATGAG	TGTTGTATTA	AAGAAAGTTT	12960
TAATGATGAA	CATATTAATC	CAGAGTCTAC	ATTAGAATTA	ATTCGATATC	CTGAAAGTAA	13020
TGAATTTATT	TATGATAAAG	ACCCACTCAA	AGATGTGGAC	TTATCAAAAC	TTATGGTTAT	13080
TAAAGACCAT	TCTTACACAA	TTGATATGAA	TTATTGGGAT	GATACTGACA	TCATACATGC	13140
AATTTCAATA	TGTACTGCAA	TTACAATAGC	AGATACTATG	TCACAATTAG	ATCGAGATAA	13200
TTTAAAAGAG	ATAATAGTTA	TTGCAAATGA	TGATGATATT	AATAGCTTAA	TCACTGAATT	13260
TTTGACTCTT	GACATACTTG	TATTTCTCAA	GACATTTGGT	GGATTATTAG	TAAATCAATT	13320
TGCATACACT	CTTTATAGTC	TAAAAATAGA	AGGTAGGGAT	CTCATTGGG	ATTATATAAT	13380
GAGAACACTG	AGAGATACTT	CCCATTCAAT	ATTAAAAGTA	TTATCTAATG	CATTATCTCA	13440
TCCTAAAGTA	TTCAAGAGGT	TCTGGGATTG	TGGAGTTTAA	AACCCTATTT	ATGGTCCATA	13500
TACTGCTAGT	CAAGACCAGA	TAAAACCTGC	CCTATCTATA	TGTGAATATT	CACTAGATCT	13560
ATTTATGAGA	GAATGGTTGA	ATGGTGTATC	ACTTGAAATA	TACATTTGTG	ACAGCGATAT	13620
GGAAGTTGCA	AATGATAGGA	AACAAGCCTT	TATTTCTAGA	CACCTTTCAT	TTGTTTGTG	13680
TTTAGCAGAA	ATTGCATCTT	TCGGACCTAA	CCTGTAAAC	TTAACATACT	TGGAGAGACT	13740
TGATCTATTG	AAACAATATC	TTGAATTAAA	TATTAAAGAA	GACCCTACTC	TTAAATATGT	13800
ACAAATATCT	GGATTATTAA	TTAAATCGTT	CCCATCAACT	GTAACATACG	TAAGAAAGAC	13860
TGCAATCAAA	TATCTAAGGA	TTGCGGTAT	TAGTCCACCT	GAGGTAATTG	ATGATTGGGA	13920
TCCGGTAGAA	GATGAAAATA	TGCTGGATAA	CATTGTCAAA	ACTATAAATG	ATAACTGTAA	13980
TAAAGATAAT	AAAGGGAATA	AAATTAACAA	TTTCTGGGGA	CTAGCACTTA	AGAACTATCA	14040
AGTCCTTAAA	ATCAGATCTA	TAACAAGTGA	TTCTGATGAT	AATGATAGAC	TAGATGCTAA	14100
TACAAGTGGT	TTGACACTTC	CTCAAGGAGG	GAATTATCTA	TCGCATCAAT	TGAGATTATT	14160
CGGAATCAAC	AGCACTAGTT	GTCTGAAAGC	TCTTGAGTTA	TCACAAATTT	TAATGAAGGA	14220
AGTCAATAAA	GACAAGGACA	GGCTCTTCCT	GGGAGAAGGA	GCAGGAGCTA	TGCTAGCATG	14280
TTATGATGCC	ACATTAGGAC	CTGCAGTTAA	TTATTATAAT	TCAGGTTTGA	ATATAACAGA	14340
TGTAATTGGT	CAACGAGAAT	TGAAAATATT	TCCTTCAGAG	GTATCATTAG	TAGGTAAAAA	14400
ATTAGGAAAT	GTGACACAGA	TTCTTAACAG	GGTAAAAGTA	CTGTTCAATG	GGAATCCTAA	14460
TTCAACATGG	ATAGGAAATA	TGGAATGTGA	GAGCTTAATA	TGGAGTGAAT	TAAATGATAA	14520
GTCCATTGGA	TTAGTACATT	GTGATATGGA	AGGAGCTATC	GGTAAATCAG	AAGAACTGT	14580
TCTACATGAA	CATTATAGTG	TTATAAGAAT	TACATACTTG	ATTGGGGATG	ATGATGTTGT	14640
TTTAGTTTCC	AAAATTATAC	CTACAATCAC	TCCGAATTGG	TCTAGAATAC	TTTATCTATA	14700
TAAATTATAT	TGGAAAGATG	TAAGTATAAT	ATCACTCAAA	ACTTCTAATC	CTGCATCAAC	14760
AGAATTATAT	CTAATTTCTGA	AAGATGCATA	TTGTACTATA	ATGGAACCTA	GTGAAATTGT	14820

TTTATCAAAA	CTTAAAAGAT	TGTCACTCTT	GGAAGAAAAT	AATCTATTAA	AATGGATCAT	14880
TTTATCAAAG	AAGAGGAATA	ATGAATGGTT	ACATCATGAA	ATCAAAGAAG	GAGAAAGAGA	14940
TTATGGAATC	ATGAGACCAT	ATCATATGGC	ACTACAAATC	TTTGGATTTC	AAATCAATTT	15000
AAATCATCTG	GCGAAAGAAT	TTTATCAAC	CCCAGATCTG	ACTAATATCA	ACAATATAAT	15060
CCAAAGTTTT	CAGCGAACAA	TAAAGGATGT	TTTATTTGAA	TGGATTAATA	TAACTCATGA	15120
TGATAAGAGA	CATAAATTAG	GCGGAAGATA	TAACATATTC	CCACTGAAAA	ATAAGGGAAA	15180
GTTAAGACTG	CTATCGAGAA	GACTAGTATT	AAGTTGGATT	TCATTATCAT	TATCGACTCG	15240
ATTACTTACA	GGTCGCTTTC	CTGATGAAAA	ATTTGAACAT	AGAGCACAGA	CTGGATATGT	15300
ATCATTAGCT	GATACTGATT	TAGAATCATT	AAAGTTATTG	TCGAAAAACA	TCATTAAGAA	15360
TTACAGAGAG	TGTATAGGAT	CAATATCATA	TTGGTTTCTA	ACCAAAGAAG	TTAAATAACT	15420
TATGAAATTG	ATCGGTGGTG	CTAAATTATT	AGGAATTCCC	AGACAATATA	AAGAACCCGA	15480
AGACCAGTTA	TTAGAAAAC	ACAATCAACA	TGATGAATTT	GATATCGATT	AAAACATAAA	15540
TACAATGAAG	ATATATCCTA	ACCTTTATCT	TTAAGCCTAG	GAATAGACAA	AAAGTAAGAA	15600
AAACATGTAA	TATATATATA	CCAAACAGAG	TTCTTCTCTT	GTTTGGTTAT	AGTGAGTCGT	15660
ATTACAATC						15669

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:
AATACGACTC ACTATAACCA AACAAGAGAA C 31
- 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 3:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3:
CCAAGTACTA TGAGATGCTT CATT 24
- 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:
CCCTATAATT TCAACATGTT GAGCCTATTT G 31

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 31 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:
GATTAAAATG TTGGTCGACT TAGTTGCTTC C 31

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 38 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:
CCATAGAGAG TCCATGGAAA GCGACGCTAA AAACATC 38

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7:
CGGTGTCGTT TCTTTGTCGA CTCATTGGCA ATTGTTG 37

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 42 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:
GCAAAGCGTG CCCGGGCCAT GGACACTGAA TCTAACAATG GC 42

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 28 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9:
GAAATTCCTT AATCGATTCT CTAGATTC 28

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:
CCCATCAACT GTAACATACG TAAGAAAGAC 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 29 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11:
GGTTAGGATA TGTGACATT GTATTTATG 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 43 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 12:
GGGGTTATGC TACTGCAGGC TTTTCTC CTTAGCCAT CGG 43

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 13:
CTCCATTCTA GANTTATAAA AATTATAGAG TTCCC 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 14:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15660 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 14:

TAATACGACT	CACTATAACC	AAACAAGAGA	AGAAACTTGT	CTGGGAATAT	AAATTTAACT	60
TTAAATTAAC	TTAGGATTAA	AGACATTGAC	TAGAAGGTCA	AGAAAAGGGA	ACTCTATAAT	120
TTCAAAAATG	TTGAGCCTAT	TTGATACATT	TAATGCACGT	AGGCAAGAAA	ACATAACAAA	180
ATCAGCCGGT	GGAGCTATCA	TTCCTGGACA	GAAAAATACT	GTCTCTATAT	TCGCCCTTGG	240
ACCGACAATA	ACTGATGATA	ATGAGAAAAT	GACATTAGCT	CTTCTATTTT	TATCTCATTC	300
ACTAGATAAT	GAGAAACAAC	ATGCACAAAG	GGCAGGGTTC	TTGGTGTCTT	TATTGTCAAT	360
GGCTTATGCC	AATCCAGAGC	TCTACCTAAC	AACAAATGGA	AGTAATGCAG	ATGTCAAGTA	420
TGTCATATAC	ATGATTGAGA	AAGATCTAAA	ACGGCAAAAG	TATGGAGGAT	TTGTGGTTAA	480
GACGAGAGAG	ATGATATATG	AAAAGACAAC	TGATTGGATA	TTTGGAAAGT	ACCTGGATTA	540
TGATCAGGAA	ACTATGTTGC	AGAACGGCAG	GAACAATTCA	ACAATTGAAG	ACCTTGTTCCA	600
CACATTTGGG	TATCCATCAT	GTTTAGGAGC	TCTTATAATA	CAGATCTGGA	TAGTTCTGGT	660
CAAAGCTATC	ACTAGTATCT	CAGGGTTAAG	AAAAGGCTTT	TTCACCCGAT	TGGAAGCTTT	720
CAGACAAGAT	GGAACAGTGC	AGGCAGGGCT	GGTATTGAGC	GGTGACACAG	TGGATCAGAT	780
TGGGTCAATC	ATGCGGTCTC	AACAGAGCTT	GGTAACTCTT	ATGGTTGAAA	CATTAATAAC	840
AATGAATACC	AGCAGAAATG	ACCTCACAAC	CATAGAAAAG	AATATACAAA	TTGTTGGCAA	900
CTACATAAGA	GATGCAGGTC	TCGCTTCATT	CTTCAATACA	ATCAGATATG	GAATTGAGAC	960
CAGAAATGGCA	GCTTTGACTC	TATCCACTCT	CAGACCAGAT	ATCAATAGAT	TAAAAGCTTT	1020
GATGGAACTG	TATTTATCAA	AGGGACCACG	CGCTCCTTTC	ATCTGTATCC	TCAGAGATCC	1080
TATACATGGT	GAGTTCGCAC	CAGGCAACTA	TCCTGCCATA	TGGAGCTATG	CAATGGGGGT	1140
GGCAGTTGTA	CAAAATAGAG	CCATGCAACA	GTATGTGACG	GGAAGATCAT	ATCTAGACAT	1200
TGATATGTTT	CAGCTAGGAC	AAGCAGTAGC	ACGTGATGCC	GAAGCTCAAA	TGAGCTCAAC	1260

20

ACTGGAAGAT	GAACCTGGAG	TGACACACGA	ATCTAAAGAA	AGCTTGAAGA	GACATATAAG	1320
GAACATAAAC	AGTTCAGAGA	CATCTTTCCA	CAAACCGACA	GGTGGATCAG	CCATAGAGAT	1380
GGCAATAGAT	GAAGAGCCAG	AACAATTCGA	ACATAGAGCA	GATCAAGAAC	AAAATGGAGA	1440
ACCTCAATCA	TCCATAATTC	AATATGCCTG	GGCAGAAGGA	AATAGAAGCG	ATGATCAGAC	1500
TGAGCAAGCT	ACAGAATCTG	ACAATATCAA	GACCGAACAA	CAAAACATCA	GAGACAGACT	1560
AAACAAGAGA	CTCAACGACA	AGAAGAAACA	AAGCAGTCAA	CCACCCACTA	ATCCCACAAA	1620
CAGAACAAAC	CAGGACGAAA	TAGATGATCT	GTTTAAACGA	TTTGGAAGCA	ACTAATCGAA	1680
TCAACATTTT	AATCTAAATC	AATAATAAAT	AAGAAAAACT	TAGGATTAAA	GAATCCTATC	1740
ATACCGGAAT	ATAGGGTGGT	AAATTTAGAG	TCTGCTTGAA	ACTCAATCAA	TAGAGAGTTG	1800
ATGGAAGCG	ATGCTAAAAA	CTATCAAATC	ATGGATTCTT	GGGAAGAGGA	ATCAAGAGAT	1860
AAATCAACTA	ATATCTCCTC	GGCCCTCAAC	ATCATTGAAT	TCATACTCAG	CACCGACCCC	1920
CAAGAAGACT	TATCGGAAAA	CGACACAATC	AACACAAGAA	CCCAGCAACT	CAGTGCCACC	1980
ATCTGTCAAC	CAGAAATCAA	ACCAACAGAA	ACAAGTGAGA	AAGATAGTGG	ATCAACTGAC	2040
AAAAATAGAC	AGTCTGGGTC	ATCACACGAA	TGTACAACAG	AAGCAAAAGA	TAGAAATATT	2100
GATCAGGAAA	CTGTACAGAG	AGGACCTGGG	AGAAGAAGCA	GCTCAGATAG	TAGAGCTGAG	2160
ACTGTGGTCT	CTGGAGGAAT	CCCCAGAAGC	ATCACAGATT	CTAAAAATGG	AACCCAAAAC	2220
ACGGAGGATA	TTGATCTCAA	TGAAATTAGA	AAGATGGATA	AGGACTCTAT	TGAGGGGAAA	2280
ATGCGACAAT	CTGCAAATGT	TCCAAGCGAG	ATATCAGGAA	GTGATGACAT	ATTTACAACA	2340
GAACAAAGTA	GAAACAGTGA	TCATGGAAGA	AGCCTGGAAT	CTATCAGTAC	ACCTGATACA	2400
AGATCAATAA	GTGTTGTTAC	TGCTGCAACA	CCAGATGATG	AAGAAGAAAT	ACTAATGAAA	2460
AATAGTAGGA	CAAAGAAAAG	TTCTTCAACA	CATCAAGAAG	ATGACAAAAG	AATTAAAAAA	2520
GGGGGAAAAG	GGAAAGACTG	GTTTAAGAAA	TCAAAAGATA	CCGACAACCA	GATACCAACA	2580
TCAGACTACA	GATCCACATC	AAAAGGGCAG	AAGAAAATCT	CAAAGACAAC	AACCACCAAC	2640
ACCGACACAA	AGGGGCAAAC	AGAAATACAG	ACAGAATCAT	CAGAAACACA	ATCCTCATCA	2700
TGGAATCTCA	TCATCGACAA	CAACACCGAC	CGGAACGAAC	AGACAAGCAC	AATCCTCCA	2760
ACAACAACCT	CCAGATCAAC	TTATACAAAA	GAATCGATCC	GAACAACTC	TGAATCCAAA	2820
CCCAAGACAC	AAAAGACAAA	TGGAAAGGAA	AGGAAGGATA	CAGAAGAGAG	CAATCGATTT	2880
ACAGAGAGGG	CAATTACTCT	ATTGCAGAAT	CTTGGTGTAA	TTCAATCCAC	ATCAAACTA	2940
GATTTATATC	AAGACAAACG	AGTTGTATGT	GTAGCAAATG	TACTAAACAA	TGTAGATACT	3000
GCATCAAAGA	TAGATTTCTT	GGCAGGATTA	GTCATAGGGG	TTTCAATGGA	CAACGACACA	3060
AAATTAACAC	AGATACAAAA	TGAAATGCTA	AACCTCAAAG	CAGATCTAAA	GAAAATGGAC	3120
GAATCACATA	GAAGATTGAT	AGAAAATCAA	AGAGAACAAC	TGTCATTGAT	CACGTCACTA	3180
ATTTCAAATC	TCAAATTAT	GACTGAGAGA	GGAGGAAAGA	AAGACCAAAA	TGAATCCAAT	3240
GAGAGAGTAT	CCATGATCAA	AACAAAATTG	AAAGAAGAAA	AGATCAAGAA	GACCAGGTTT	3300
GACCCACTTA	TGGAGGCACA	AGGCATTGAC	AAGAATATAC	CCGATCTATA	TCGACATGCA	3360

GGAGATACAC TAGAGAACGA TGTACAAGTT AAATCAGAGA TATTAAGTTC ATACAATGAG	3420
TCAAATGCAA CAAGACTAAT ACCCAAAAAA GTGAGCAGTA CAATGAGATC ACTAGTTGCA	3480
GTCATCAACA ACAGCAATCT CTCACAAAGC ACAAACAAT CATACTAAA CGAACTCAAA	3540
CGTTGCAAAA ATGATGAAGA AGTATCTGAA TTAATGGACA TGTTCATGA AGATGTCAAC	3600
AATTGCCAAT GATCCAACAA AGAAACGACA CCGAACAAAC AGACAAGAAA CAACAGTAGA	3660
TCAAAACCTG TCAACACACA CAAAATCAAG CAGAATGAAA CAACAGATAT CAATCAATAT	3720
ACAAATAAGA AAAACTTAGG ATTAAGAAT AAATTAATCC TTGTCCAAA TGAGTATAAC	3780
TAACCTGCA ATATACACAT TCCCAGAATC ATCATTTCTT GAAAATGGTC ATATAGAACC	3840
ATTACCACTC AAAGTCAATG AACAGAGGAA AGCAGTACCC CACATTAGAG TTGCCAAGAT	3900
CGGAAATCCA CCAAAACACG GATCCCGGTA TTTAGATGTC TTCTTACTCG GCTTCTTCGA	3960
GATGGAACGA ATCAAAGACA AATACGGGAG TGTGAATGAT CTCGACAGTG ACCCGAGTTA	4020
CAAAGTTTGT GGCTCTGGAT CATTACCAAT CGGATTGGCT AAGTACACTG GGAATGACCA	4080
GGAATTGTTA CAAGCCGCAA CCAAAGTGA TATAGAAGTG AGAAGAACAG TCAAAGCGAA	4140
AGAGATGGTT GTTTACACGG TACAAAATAT AAAACCAGAA CTGTACCCAT GGTCCAATAG	4200
ACTAAGAAAA GGAATGCTGT TCGATGCCAA CAAAGTTGCT CTTGCTCCTC AATGTCTTCC	4260
ACTAGATAGG AGCATAAAAT TTAGAGTAAT CTTTCGTGAAT TGTACGGCAA TTGGATCAAT	4320
AACCTTGTTT AAAATTCCCTA AGTCAATGGC ATCACTATCT CTACCCAACA CAATATCAAT	4380
CAATCTGCAG GTACACATAA AAACAGGGGT TCAGACTGAT TCTAAAGGGA TAGTTCAAAT	4440
TTTGGATGAG AAAGGCGAAA AATCACTGAA TTTCATGGTC CATCTCGGAT TGATCAAAAG	4500
AAAAGTAGGC AGAATGTACT CTGTTGAATA CTGTAAACAG AAAATCGAGA AAATGAGATT	4560
GATATTTTCT TTAGGACTAG TTGGAGGAAT CAGTCTTCAT GTCAATGCAA CTGGGTCCAT	4620
ATCAAAAACA CTAGCAAGTC AGCTGGTATT CAAAAGAGAG ATTTGTTATC CTTTAATGGA	4680
TCTAAATCCG CATCTCAATC TAGTTATCTG GGCTTCATCA GTAGAGATTA CAAGAGTGGA	4740
TGCAATTTTC CAACCTTCTT TACCTGGCGA GTTCAGATAC TATCCTAATA TTATTGCAAA	4800
AGGAGTTGGG AAAATCAAAC AATGGAACCTA GTAATCTCTA TTTTAGTCCG GACGTATCTA	4860
TTAAGCCGAA GCAAATAAAG GATAATCAAA AACTTAGGAC AAAAGAGGTC AATACCAACA	4920
ACTATTAGCA GTCACACTCG CAAGAATAAG AGAGAAGGGA CCAAAAAAGT CAAATAGGAG	4980
AAATCAAAAC AAAAGGTACA GAACACCAGA ACAACAAAAT CAAAACATCC AACTCACTCA	5040
AAACAAAAT TCCAAAAGAG ACCGGCAACA CAACAAGCAC TGAACACAAT GCCAACTTCA	5100
ATACTGCTAA TTATTACAAC CATGATCATG GCATCTTTCT GCCAAATAGA TATCACAAAA	5160
CTACAGCACG TAGGTGTATT GGTCAACAGT CCCAAAGGGA TGAAGATATC ACAAACCTTT	5220
GAAACAAGAT ATCTAATTTT GAGCCTCATA CCAAAAATAG AAGACTCTAA CTCTTGTTGGT	5280
GACCAACAGA TCAAGCAATA CAAGAAGTTA TTGGATAGAC TGATCATCCC TTTATATGAT	5340
GGATTAAGAT TACAGAAAGA TGTGATAGTA ACCAATCAAG AATCCAATGA AAACACTGAT	5400
CCCAGAACAA AACGATTCTT TGGAGGGGTA ATTGGAACCA TGCTCTGGG AGTAGCAACC	5460

TCAGCACAAA	TTACAGCGGC	AGTTGCTCTG	GTTGAAGCCA	AGCAGGCAAG	ATCAGACATC	5520
GAAAAACTCA	AAGAAGCAAT	TAGGGACACA	AACAAAGCAG	TGCAGTCAGT	TCAGAGCTCC	5580
ATAGGAAATT	TAATAGTAGC	AATTAAATCA	GTCCAGGATT	ATGTTAACAA	AGAAATCGTG	5640
CCATCGATTG	CGAGGCTAGG	TTGTGAAGCA	GCAGGACTTC	AATTAGGAAT	TGCATTAACA	5700
CAGCATTACT	CAGAATTAAC	AAACATATTT	GGTGATAACA	TAGGATCGTT	ACAAGAAAAA	5760
GGAATAAAAT	TACAAGGTAT	AGCATCATT	TACCGCACAA	ATATCACAGA	AATATTCCAA	5820
ACATCAACAG	TTGATAAATA	TGATATCTAT	GATCTGTTAT	TTACAGAATC	AATAAAGGTG	5880
AGAGTTATAG	ATGTTGACTT	GAATGATTAC	TCAATCACCC	TCCAAGTCAG	ACTCCCTTTA	5940
TTAACTAGGC	TGCTGAACAC	TCAGATCTAC	AAAGTAGATT	CCATATCATA	TAACATCCAA	6000
AACAGAGAAT	GGTATATCCC	TCTTCCCAGC	CATATCATGA	CGAAAGGGGC	ATTCTAGGT	6060
GGAGCAGACG	TCAAAGAATG	TATAGAAGCA	TTCAGCAGCT	ATATATGCCC	TTCTGATCCA	6120
GGATTGTAT	TAAACCATGA	AATAGAGAGC	TGCTTATCAG	GAAACATATC	CCAATGTCCA	6180
AGAACAACGG	TCACATCAGA	CATTGTTCCA	AGATATGCAT	TTGTCAATGG	AGGAGTGGTT	6240
GCAAACGTGA	TAACAACCAC	CTGTACATGC	AACGGAATTG	GTAATAGAAT	CAATCAACCA	6300
CCTGATCAAG	GAGTAAAAAT	TATAACACAT	AAAGAATGTA	GTACAATAGG	TATCAACGGA	6360
ATGCTGTTCA	ATACAAATAA	AGAAGGAACT	CTTGCAATTCT	ATACACCAA	TGATATAACA	6420
CTAAACAATT	CTGTTGCACT	TGATCCAATT	GACATATCAA	TCGAGCTCAA	CAAGGCCAAA	6480
TCAGATCTAG	AAGAAATCAA	AGAATGGATA	AGAAGGTCAA	ATCAAAAATC	AGATTCTATT	6540
GGAAATTGGC	ATCAATCTAG	CACTACAATC	ATAATTATTT	TGATAATGAT	CATTATATTG	6600
TTTATAATTA	ATATAACGAT	AATTACAATT	GCAATTAAAGT	ATTACAGAAT	TCAAAGAGA	6660
AATCGAGTGG	ATCAAAATGA	CAAGCCATAT	GTAATAACAA	ACAAATAACA	TATCTACAGA	6720
TCATTAGATA	TTAAATTTAT	AAAAACTTA	GGAGTAAAGT	TACGCAATCC	AACTCTACTC	6780
ATATAATTGA	GGAAGGACCC	AATAGACAAA	TCCAAATTCG	AGATGGAATA	CTGGAAGCAT	6840
ACCAATCACG	GAAAGGATGC	TGGTAATGAG	CTGGAGACGT	CTATGGCTAC	TCATGGCAAC	6900
AAGCTCACTA	ATAAGATAAT	ATACATATTA	TGGACAATAA	TCCTGGTGTT	ATTATCAATA	6960
GTCCTCATCA	TAGTGCTAAT	TAATTCCATC	AAAAGTGAAA	AGGCCACGA	ATCATTGCTG	7020
CAAGACATAA	ATAATGAGTT	TATGGAAATT	ACAGAAAAGA	TCCAAATGGC	ATCGGATAAT	7080
ACCAATGATC	TAATACAGTC	AGGAGTGAAT	ACAAGGCTTC	TTACAATTCA	GAGTCATGTC	7140
CAGAATTACA	TACCAATATC	ATTGACACAA	CAGATGTCAG	ATCTTAGGAA	ATTCAATTAGT	7200
GAAATTACAA	TTAGAAATGA	TAATCAAGAA	GTGCTGCCAC	AAAGAATAAC	ACATGATGTA	7260
GGTATAAAAC	CTTTAAATCC	AGATGATTTT	TGGAGATGCA	CGTCTGGTCT	TGCATCTTTA	7320
ATGAAAACTC	CAAAAATAAG	GTTAATGCCA	GGGCCGGGAT	TATTAGCTAT	GCCAACGACT	7380
GTTGATGGCT	GTGTTAGAAC	TCCGTCTTTA	GTTATAAATG	ATCTGATTTA	TGCTTATACC	7440
TCAAATCTAA	TTACTCGAGG	TTGTCAGGAT	ATAGGAAAAT	CATATCAAGT	CTTACAGATA	7500
GGGATAATAA	CTGTAAACTC	AGACTTGGTA	CCTGACTTAA	ATCCTAGGAT	CTCTCATACC	7560

TTTAACATAA	ATGACAATAG	GAAGTCATGT	TCTCTAGCAC	TCCTAAATAT	AGATGTATAT	7620
CAACTGTGTT	CAACTCCCAA	AGTTGATGAA	AGATCAGATT	ATGCATCATC	AGGCATAGAA	7680
GATATTGTAC	TTGATATTGT	CAATTATGAT	GGTTCAATCT	CAACAACAAG	ATTTAAGAAT	7740
AATAACATAA	GCTTTGATCA	ACCATATGCT	GCACTATACC	CATCTGTTGG	ACCAGGGATA	7800
TACTACAAAG	GCAAAATAAT	ATTTCTCGGG	TATGGAGGTC	TTGAACATCC	AATAAATGAG	7860
AATGTAATCT	GCAACACAAC	TGGGTGCCCC	GGGAAAACAC	AGAGAGACTG	TAATCAAGCA	7920
TCTCATAGTA	CTTGGTTTTT	AGATAGGAGG	ATGGTCAACT	CCATCATTGT	TGTTGACAAA	7980
GGCTTAAACT	CAATTCCAAA	ATTGAAAGTA	TGGACGATAT	CTATGCGACA	AAATTACTGG	8040
GGGTGAGAAG	GAAGGTTACT	TCTACTAGGT	AACAAGATCT	ATATATATAC	AAGATCTACA	8100
AGTTGGCATA	GCAAGTTACA	ATTAGGAATA	ATTGATATTA	CTGATTACAG	TGATATAAGG	8160
ATAAATGGA	CATGGCATAA	TGTGCTATCA	AGACCAGGAA	ACAATGAATG	TCCATGGGGA	8220
CATTTCATGTC	CAGATGGATG	TATAACAGGA	GTATATACTG	ATGCATATCC	ACTCAATCCC	8280
ACAGGGAGCA	TTGTGTCATC	TGTCATATTA	GACTCACAAA	AATCGAGAGT	GAACCCAGTC	8340
ATAACTTACT	CAACAGCAAC	CGAAAGAGTA	AACGAGCTGG	CCATCCTAAA	CAGAACACTC	8400
TCAGCTGGAT	ATACAACAAC	AAGCTGCATT	ACACACTATA	ACAAAGGATA	TTGTTTTTCAT	8460
ATAGTAGAAA	TAAATCATAA	AAGCTTAAAC	ACATTTCAAC	CCATGTTGTT	CAAAACAGAG	8520
ATTCCAAAAA	GCTGCAGTTA	ATCATAATTA	ACCATAATAT	GCATCAATCT	ATCTATAATA	8580
CAAGTATATG	ATAAGTAATC	AGCAATCAGA	CAATAGACAA	AAGGGAAATA	TAAAAAACTT	8640
AGGAGCAAAG	CGTGCTCGGG	AAATGGACAC	TGAATCTAAC	AATGGCACTG	TATCTGACAT	8700
ACTCTATCCT	GAGTGTCAAC	TTAACTCTCC	TATCGTTAAA	GGTAAAATAG	CACAATTACA	8760
CACTATTATG	AGTCTACCTC	AGCCTTATGA	TATGGATGAC	GACTCAATAC	TAGTTATCAC	8820
TAGACAGAAA	ATAAACTTAA	ATAAATTGGA	TAAAAGACAA	CGATCTATTA	GAAGATTAAA	8880
ATTAATATTA	ACTGAAAAAG	TGAATGACTT	AGGAAAATAC	ACATTTATCA	GATATCCAGA	8940
AATGTCAAAA	GAAATGTTCA	AATTATATAT	ACCTGGTATT	AACAGTAAAG	TGACTGAATT	9000
ATTACTTAAA	GCAGATAGAA	CATATAGTCA	AATGACTGAT	GGATTAAGAG	ATCTATGGAT	9060
TAATGTGCTA	TCAAAATTAG	CCTCAAAAAA	TGATGGAAGC	AATTATGATC	TTAATGAAGA	9120
AATTAATAAT	ATATCGAAAG	TTCACACAAC	CTATAAATCA	GATAAATGGT	ATAATCCATT	9180
CAAAACATGG	TTTACTATCA	AGTATGATAT	GAGAAGATTA	CAAAAAGCTC	GAAATGAGAT	9240
CACTTTTAAT	GTTGGGAAGG	ATTATAACTT	GTTAGAAGAC	CAGAAGAATT	TCTTATTGAT	9300
ACATCCAGAA	TTGGTTTGA	TATTAGATAA	ACAAAACATAT	AATGGTTATC	TAATTACTCC	9360
TGAATTAGTA	TTGATGTATT	GTGACGTAGT	CGAAGGCCGA	TGGAATATAA	GTGCATGTGC	9420
TAAGTTAGAT	CCAAAATTAC	AATCTATGTA	TCAGAAAGGT	AATAACCTGT	GGGAAGTGAT	9480
AGATAAATTG	TTTCCAATTA	TGGGAGAAAA	GACATTTGAT	GTGATATCGT	TATTAGAACC	9540
ACTTGCATTA	TCCTTAATTC	AAACTCATGA	TCCTGTTAAA	CAACTAAGAG	GAGCTTTTTT	9600
AAATCATGTG	TTATCGGAGA	TGGAATTAAT	ATTTGAATCT	AGAGAATCGA	TTAAGGAATT	9660

TCTGAGTGTA	GATTACATTG	ATAAAATTTT	AGATATATTT	AATAAGTCTA	CAATAGATGA	9720
AATAGCAGAG	ATTTTCTCTT	TTTTTAGAAC	ATTGGGCAT	CCTCCATTAG	AAGCTAGTAT	9780
TGCAGCAGAA	AAGGTTAGAA	AATATATGTA	TATTGGAAAA	CAATTAAAAT	TTGACACTAT	9840
TAATAAATGT	CATGCTATCT	TCTGTACAAT	AATAATTAAC	GGATATAGAG	AGAGGCATGG	9900
TGGACAGTGG	CCTCCTGTGA	CATTACCTGA	TCATGCACAC	GAATTCATCA	TAAATGCTTA	9960
CGGTTCAAAC	TCTGCGATAT	CATATGAAAA	TGCTGTTGAT	TATTACCAGA	GCTTTATAGG	10020
AATAAAATTC	AATAAATTCA	TAGAGCCTCA	GTTAGATGAG	GATTTGACAA	TTTATATGAA	10080
AGATAAAGCA	TTATCTCCAA	AAAAATCAAA	TTGGGACACA	GTTTATCCTG	CATCTAATTT	10140
ACTGTACCGT	ACTAACGCAT	CCAACGAATC	ACGAAGATTA	GTTGAAGTAT	TTATAGCAGA	10200
TAGTAAATTT	GATCCTCATC	AGATATTGGA	TTATGTAGAA	TCTGGGGACT	GGTTAGATGA	10260
TCCAGAATTT	AATATTTCTT	ATAGTCTTAA	AGAAAAAGAG	ATCAAACAGG	AAGGTAGACT	10320
CTTTGCAAAA	ATGACATACA	AAATGAGAGC	TACACAAGTT	TTATCAGAGA	CCCTACTTGC	10380
AAATAACATA	GGAAAATTCT	TTCAAGAAAA	TGGGATGGTG	AAGGGAGAGA	TTGAATTACT	10440
TAAGAGATTA	ACAACCATAT	CAATATCAGG	AGTTCCACGG	TATAATGAAG	TGTACAATAA	10500
TTCTAAAAGC	CATACAGATG	ACCTTAAAAAC	CTACAATAAA	ATAAGTAATC	TTAATTTGTC	10560
TTCTAATCAG	AAATCAAAGA	AATTTGAATT	CAAGTCAACG	GATATCTACA	ATGATGGATA	10620
CGAGACTGTG	AGCTGTTTCC	TAACAACAGA	TCTCAAAAAA	TACTGTCTTA	ATTGGAGATA	10680
TGAATCAACA	GCTCTATTTG	GAGAACTTG	CAACCAAATA	TTTGGATTAA	ATAAATTGTT	10740
TAATTTGGTTA	CACCCTCGTC	TTGAAGGAAG	TACAATCTAT	GTAGGTGATC	CTTACTGTCC	10800
TCCATCAGAT	AAAGAACATA	TATCATTAGA	GGATCACCTT	GATTCTGGTT	TTTACGTTCA	10860
TAACCCAAGA	GGGGGTATAG	AAGGATTTTG	TCAAAAATTA	TGGACACTCA	TATCTATAAG	10920
TGCAATACAT	CTAGCAGCTG	TTAGAATAGG	CGTGAGGGTG	ACTGCAATGG	TTCAAGGAGA	10980
CAATCAAGCT	ATAGCTGTAA	CCACAAGAGT	ACCCAACAAT	TATGACTACA	GAGTTAAGAA	11040
GGAGATAGTT	TATAAAGATG	TAGTGAGATT	TTTTGATTCA	TTAAGAGAAG	TGATGGATGA	11100
TCTAGGTCAT	GAACTTAAAT	TAAATGAAAC	GATTATAAGT	AGCAAGATGT	TCATATATAG	11160
CAAAAGAATC	TATTATGATG	GGAGAATTCT	TCCTCAAGCT	CTAAAAGCAT	TATCTAGATG	11220
TGTCTTCTGG	TCAGAGACAG	TAATAGACGA	AACAAGATCA	GCATCTTCAA	ATTTGGCAAC	11280
ATCATTTGCA	AAAGCAATTG	AGAATGGTTA	TTCACCTGTT	CTAGGATATG	CATGCTCAAT	11340
TTTTAAGAAT	ATTCAACAAC	TATATATTGC	CCTTGGGATG	AATATCAATC	CAACTATAAC	11400
ACAGAATATC	AGAGATCAGT	ATTTTAGGAA	TCCAAATTGG	ATGCAATATG	CCTCTTTAAT	11460
ACCTGCTAGT	GTTGGGGGAT	TCAATTACAT	GGCCATGTCA	AGATGTTTTG	TAAGGAATAT	11520
TGGTGATCCA	TCAGTTGCCG	CATTGGCTGA	TATTAAAAGA	TTTATTAAGG	CGAATCTATT	11580
AGACCGAAGT	GTTCTTTATA	GGATTATGAA	TCAAGAACCA	GGTGAGTCAT	CTTTTTTGGA	11640
CTGGGCTTCA	GATCCATATT	CATGCAATTT	ACCACAATCT	CAAAATATAA	CCACCATGAT	11700
AAAAAATATA	ACAGCAAGGA	ATGTATTACA	AGATTCACCA	AATCCATTAT	TATCTGGATT	11760

ATTCACAAAT	ACAATGATAG	AAGAAGATGA	AGAATTAGCT	GAGTTCCTGA	TGGACAGGAA	11820
GGTAATTCTC	CCTAGAGTTG	CACATGATAT	TCTAGATAAT	TCTCTCACAG	GAATTAGAAA	11880
TGCCATAGCT	GGAATGTTAG	ATACGACAAA	ATCACTAATT	CGGGTTGGCA	TAAATAGAGG	11940
AGGACTGACA	TATAGTTTGT	TGAGGAAAAT	CAGTAATTAC	GATCTAGTAC	AATATGAAAC	12000
ACTAAGTAGG	ACTTTGCGAC	TAATTGTAAG	TGATAAAATC	AAGTATGAAG	ATATGTGTTC	12060
GGTAGACCTT	GCCATAGCAT	TGCGACAAAA	GATGTGGATT	CATTTATCAG	GAGGAAGGAT	12120
GATAAGTGGA	CTTGAAACGC	CTGACCCATT	AGAATTACTA	TCTGGGGTAG	TAATAACAGG	12180
ATCAGAACAT	TGTAAAATAT	GTTATTCTTC	AGATGGCACA	AACCCATATA	CTTGGATGTA	12240
TTTACCCGGT	AATATCAAAA	TAGGATCAGC	AGAAACAGGT	ATATCGTCAT	TAAGAGTTCC	12300
TTATTTTGGA	TCAGTCACTG	ATGAAAGATC	TGAAGCACAA	TTAGGATATA	TCAAGAATCT	12360
TAGTAAACCT	GCAAAAGCCG	CAATAAGAA	AGCAATGATA	TATACATGGG	CATTTGGTAA	12420
TGATGAGATA	TCTTGGATGG	AAGCCTCACA	GATAGCACAA	ACACGTGCAA	ATTTTACACT	12480
AGATAGTCTC	AAAATTTTAA	CACCGGTAGC	TACATCAACA	AATTTATCAC	ACAGATTAAA	12540
GGATACTGCA	ACTCAGATGA	AATTCTCCAG	TACATCATTG	ATCAGAGTCA	GCAGATTTCAT	12600
AACAATGTCC	AATGATAACA	TGTCTATCAA	AGAAGCTAAT	GAAACCAAAG	ATACTAATCT	12660
TATTTATCAA	CAAATAATGT	TAACAGGATT	AAGTGTTTTT	GAATATTTAT	TTAGATTAAA	12720
AGAAACCACA	GGACACAACC	CTATAGTTAT	GCATCTGCAC	ATAGAAGATG	AGTGTTGTAT	12780
TAAAGAAAGT	TTTAATGATG	AACATATTAA	TCCAGAGTCT	ACATTAGAAT	TAATTCGATA	12840
TCCTGAAAGT	AATGAATTTA	TTTATGATAA	AGACCCACTC	AAAGATGTGG	ACTTATCAAA	12900
ACTTATGGTT	ATTAAAGACC	ATTCTTACAC	AATTGATATG	AATTATTGGG	ATGATACTGA	12960
CATCATACAT	GCAATTTCAA	TATGTACTGC	AATTACAATA	GCAGATACTA	TGTCACAATT	13020
AGATCGAGAT	AATTTAAAAG	AGATAATAGT	TATTGCAAAT	GATGATGATA	TTAATAGCTT	13080
AATCACTGAA	TTTTTGACTC	TTGACATACT	TGTATTTCTC	AAGACATTTG	GTGGATTATT	13140
AGTAAATCAA	TTTGCATACA	CTCTTTATAG	TCTAAAAATA	GAAGGTAGGG	ATCTCATTTG	13200
GGATTATATA	ATGAGAACAC	TGAGAGATAC	TTCCCATTC	ATATTAAAAG	TATTATCTAA	13260
TGCATTATCT	CATCCTAAAG	TATTCAAGAG	GTTCTGGGAT	TGTGGAGTTT	TAAACCTTAT	13320
TTATGGTCCT	AATACTGCTA	GTCAAGACCA	GATAAACTT	GCCCTATCTA	TATGTGAATA	13380
TTCACTAGAT	CTATTTATGA	GAGAATGGTT	GAATGGTGTA	TCACTTGAAA	TATACATTTG	13440
TGACAGCGAT	ATGGAAGTTG	CAAATGATAG	GAAACAAGCC	TTTATTTCTA	GACACCTTTC	13500
ATTTGTTTTGT	TGTTTAGCAG	AAATGTCATC	TTTGGGACCT	AACCTGTTAA	ACTTAACATA	13560
CTTGGAGAGA	CTTGATCTAT	TGAAACAATA	TCTTGAATTA	AATATTAAAG	AAGACCCTAC	13620
TCTTAAATAT	GTACAAATAT	CTGGATTATT	AATTAAATCG	TTCCCATCAA	CTGTAACATA	13680
CGTAAGAAAG	ACTGCAATCA	AATATCTAAG	GATTCGCGGT	ATTAGTCCAC	CTGAGGTAAT	13740
TGATGATTGG	GATCCGGTAG	AAGATGAAAA	TATGCTGGAT	AACATTGTCA	AAACTATAAA	13800
TGATAACTGT	AATAAAGATA	ATAAAGGGAA	TAAAATTAAC	AATTTCTGGG	GACTAGCACT	13860

TAAGAACTAT	CAAGTCCTTA	AAATCAGATC	TATAACAAGT	GATTCTGATG	ATAATGATAG	13920
ACTAGATGCT	AATACAAGTG	GTTTGACACT	TCCTCAAGGA	GGGAATTATC	TATCGCATCA	13980
ATTGAGATTA	TTCGGAATCA	ACAGCACTAG	TTGTCTGAAA	GCTCTTGAGT	TATCACAAAT	14040
TTTAATGAAG	GAAGTCAATA	AAGACAAGGA	CAGGCTCTTC	CTGGGAGAAG	GAGCAGGAGC	14100
TATGCTAGCA	TGTTATGATG	CCACATTAGG	ACCTGCAGTT	AATTATTATA	ATTCAGGTTT	14160
GAATATAACA	GATGTAATTG	GTCAACGAGA	ATTGAAAATA	TTCCCTTCAG	AGGTATCATT	14220
AGTAGGTAAA	AAATTAGGAA	ATGTGACACA	GATTCTTAAC	AGGGTAAAAG	TACTGTTCAA	14280
TGGGAATCCT	AATTCAACAT	GGATAGGAAA	TATGGAATGT	GAGAGCTTAA	TATGGAGTGA	14340
ATTAAATGAT	AAGTCCATTG	GATTAGTACA	TTGTGATATG	GAAGGAGCTA	TCGGTAAATC	14400
AGAAGAAACT	GTTCTACATG	AACATTATAG	TGTTATAAGA	ATTACATACT	TGATTGGGGA	14460
TGATGATGTT	GTTTTAGTTT	CCAAAATTAT	ACCTACAATC	ACTCCGAATT	GGTCTAGAAT	14520
ACTTTATCTA	TATAAATTAT	ATTGGAAAGA	TGTAAGTATA	ATATCACTCA	AAACTTCTAA	14580
TCCTGCATCA	ACAGAATTAT	ATCTAATTTT	GAAAGATGCA	TATTGTACTA	TAATGGAAAC	14640
TAGTGAAATT	GTTTTATCAA	AACTTAAAAG	ATTGTCACTC	TTGGAAGAAA	ATAATCTATT	14700
AAAATGGATC	ATTTTATCAA	AGAAGAGGAA	TAATGAATGG	TTACATCATG	AAATCAAAGA	14760
AGGAGAAAGA	GATTATGGAA	TCATGAGACC	ATATCATATG	GCACTACAAA	TCTTTGGATT	14820
TCAAATCAAT	TTAAATCATC	TGGCGAAAGA	ATTTTTATCA	ACCCCAGATC	TGACTAATAT	14880
CAACAATATA	ATCCAAAGTT	TTCAGCGAAC	AATAAAGGAT	GTTTTATTTG	AATGGATTAA	14940
TATAACTCAT	GATGATAAGA	GACATAAATT	AGGCGGAAGA	TATAACATAT	TCCCACTGAA	15000
AAATAAGGGA	AAGTTAAGAC	TGCTATCGAG	AAGACTAGTA	TTAAGTTGGA	TTTCATTATC	15060
ATTATCGACT	CGATTACTTA	CAGGTCGCTT	TCCTGATGAA	AAATTTGAAC	ATAGAGCACA	15120
GACTGGATAT	GTATCATTAG	CTGATACTGA	TTTAGAATCA	TTAAAGTTAT	TGTCGAAAAA	15180
CATCATTAAG	AATTACAGAG	AGTGTATAGG	ATCAATATCA	TATTGGTTTC	TAACCAAAGA	15240
AGTTAAAATA	CTTATGAAAT	TGATCGGTGG	TGCTAAATTA	TTAGGAATTC	CCAGACAATA	15300
TAAAGAACCC	GAAGACCAGT	TATTAGAAAA	CTACAATCAA	CATGATGAAT	TTGATATCGA	15360
TTAAAACATA	AATACAATGA	AGATATATCC	TAACCTTTAT	CTTTAAGCCT	AGGAATAGAC	15420
AAAAAGTAAG	AAAAACATGT	AATATATATA	TACCAAACAG	AGTTCTTCTC	TTGTTTGGTG	15480
GGTCGGCATG	GCATCTCCAC	CTCCTCGCGG	TCCGGACCTG	GGCATCCGAA	GGAGGACGCA	15540
CGTCCACTCG	GATGGCTAAG	GGAGAGCCTG	CAGTAGCATA	ACCCCTTGGG	GCCTCTAAAC	15600
GGGTCTTGAG	GGGTTTTTTG	CTGAAAGGAG	GAACATATATA	CGCGTCGACG	GGCCCCGCGC	15660

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 15:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15666 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 15:

TAATACGACT	CACTATAGGA	CCAAACAAGA	GAAGAACTT	GTCTGGGAAT	ATAAATTTAA	60
CTTTAAATTA	ACTTAGGATT	AAAGACATTG	ACTAGAAGGT	CAAGAAAAGG	GAAGCTCTATA	120
ATTTCAAAAA	TGTTGAGCCT	ATTTGATACA	TTTAATGCAC	GTAGGCAAGA	AAACATAACA	180
AAATCAGCCG	GTGGAGCTAT	CATTCCTGGA	CAGAAAAATA	CTGTCTCTAT	ATTCGCCCTT	240
GGACCGACAA	TAACTGATGA	TAATGAGAAA	ATGACATTAG	CTCTTCTATT	TCTATCTCAT	300
TCACTAGATA	ATGAGAAACA	ACATGCACAA	AGGGCAGGGT	TCTTGGTGTC	TTTATTGTCA	360
ATGGCTTATG	CCAATCCAGA	GCTCTACCTA	ACAACAAATG	GAAGTAATGC	AGATGTCAAG	420
TATGTCATAT	ACATGATTGA	GAAAGATCTA	AAACGGCAAA	AGTATGGAGG	ATTTGTGGTT	480
AAGACGAGAG	AGATGATATA	TGAAAAGACA	ACTGATTGGA	TATTTGGAAG	TGACCTGGAT	540
TATGATCAGG	AAACTATGTT	GCAGAACGGC	AGGAACAATT	CAACAATTGA	AGACCTTGTC	600
CACACATTTG	GGTATCCATC	ATGTTTAGGA	GCTCTTATAA	TACAGATCTG	GATAGTTCTG	660
GTCAAAGCTA	TCACTAGTAT	CTCAGGGTTA	AGAAAAGGCT	TTTTCACCCG	ATTGGAAGCT	720
TTCAGACAAG	ATGGAACAGT	GCAGGCAGGG	CTGGTATTGA	GCGGTGACAC	AGTGGATCAG	780
ATTGGGTCAA	TCATGCGGTC	TCAACAGAGC	TTGGTAACTC	TTATGGTTGA	AACATTAATA	840
ACAATGAATA	CCAGCAGAAA	TGACCTCACA	ACCATAGAAA	AGAATATACA	AATTGTTGGC	900
AACTACATAA	GAGATGCAGG	TCTCGCTTCA	TTCTTCAATA	CAATCAGATA	TGGAATTGAG	960
ACCAGAATGG	CAGCTTTGAC	TCTATCCACT	CTCAGACCAG	ATATCAATAG	ATTAAAAGCT	1020
TTGATGGAAC	TGTATTTATC	AAAGGGACCA	CGCGCTCCTT	TCATCTGTAT	CCTCAGAGAT	1080
CCTATACATG	GTGAGTTCGC	ACCAGGCAAC	TATCCTGCCA	TATGGAGCTA	TGCAATGGGG	1140
GTGGCAGTTG	TACAAAATAG	AGCCATGCAA	CAGTATGTGA	CGGGAAGATC	ATATCTAGAC	1200
ATTGATATGT	TCCAGCTAGG	ACAAGCAGTA	GCACGTGATG	CCGAAGCTCA	AATGAGCTCA	1260
ACACTGGAAG	ATGAACCTTG	AGTGACACAC	GAATCTAAAG	AAAGCTTGAA	GAGACATATA	1320
AGGAACATAA	ACAGTTCAGA	GACATCTTTC	CACAAACCGA	CAGGTGGATC	AGCCATAGAG	1380
ATGGCAATAG	ATGAAGAGCC	AGAACAATTC	GAACATAGAG	CAGATCAAGA	ACAAAATGGA	1440
GAACCTCAAT	CATCCATAAT	TCAATATGCC	TGGGCAGAAG	GAAATAGAAG	CGATGATCAG	1500
ACTGAGCAAG	CTACAGAATC	TGACAATATC	AAGACCGAAC	AACAAAACAT	CAGAGACAGA	1560
CTAAACAAGA	GACTCAACGA	CAAGAAGAAA	CAAAGCAGTC	AACCACCCAC	TAATCCCACA	1620
AACAGAACAA	ACCAGGACGA	AATAGATGAT	CTGTTTAACG	CATTTGGAAG	CAACTAATCG	1680
AATCAACATT	TTAATCTAAA	TCAATAATAA	ATAAGAAAAA	CTTAGGATTA	AAGAATCCTA	1740
TCATACCGGA	ATATAGGGTG	GTAAATTTAG	AGTCTGCTTG	AAACTCAATC	AATAGAGAGT	1800
TGATGGAAG	CGATGCTAAA	AACTATCAAA	TCATGGATTTC	TTGGGAAGAG	GAATCAAGAG	1860
ATAAATCAAC	TAATATCTCC	TCGGCCCTCA	ACATCATTTGA	ATTCATACTC	AGCACCGACC	1920

CCCAAGAAGA	CTTATCGGAA	AACGACACAA	TCAACACAAG	AACCCAGCAA	CTCAGTGCCA	1980
CCATCTGTCA	ACCAGAAATC	AAACCAACAG	AAACAAGTGA	GAAAGATAGT	GGATCAACTG	2040
ACAAAAATAG	ACAGTCTGGG	TCATCACACG	AATGTACAAC	AGAAGCAAAA	GATAGAAATA	2100
TTGATCAGGA	AACTGTACAG	AGAGGACCTG	GGAGAAGAAG	CAGCTCAGAT	AGTAGAGCTG	2160
AGACTGTGGT	CTCTGGAGGA	ATCCCCAGAA	GCATCACAGA	TTCTAAAAAT	GGAACCCAAA	2220
ACACGGAGGA	TATTGATCTC	AATGAAATTA	GAAAGATGGA	TAAGGACTCT	ATTGAGGGGA	2280
AAATGCGACA	ATCTGCAAAT	GTTCCAAGCG	AGATATCAGG	AAGTGATGAC	ATATTTACAA	2340
CAGAACAAAG	TAGAAACAGT	GATCATGGAA	GAAGCCTGGA	ATCTATCAGT	ACACCTGATA	2400
CAAGATCAAT	AAGTGTGTT	ACTGCTGCAA	CACCAGATGA	TGAAGAAGAA	ATACTAATGA	2460
AAAATAGTAG	GACAAAGAAA	AGTTCTTCAA	CACATCAAGA	AGATGACAAA	AGAATTAATA	2520
AAGGGGGAAA	AGGGAAAGAC	TGGTTTAAGA	AATCAAAAGA	TACCGACAAC	CAGATACCAA	2580
CATCAGACTA	CAGATCCACA	TCAAAAGGGC	AGAAGAAAAT	CTCAAAGACA	ACAACCACCA	2640
ACACCGACAC	AAAGGGGCAA	ACAGAAATAC	AGACAGAATC	ATCAGAAACA	CAATCCTCAT	2700
CATGGAATCT	CATCATCGAC	AACAACACCG	ACGGGAACGA	ACAGACAAGC	ACAACCTCTC	2760
CAACAACAAC	TTCCAGATCA	ACTTATACAA	AAGAATCGAT	CCGAACAAAC	TCTGAATCCA	2820
AACCCAAGAC	ACAAAAGACA	AATGGAAAAG	AAAGGAAGGA	TACAGAAGAG	AGCAATCGAT	2880
TTACAGAGAG	GGCAATTACT	CTATTGCAGA	ATCTTGGTGT	AATTCAATCC	ACATCAAAAC	2940
TAGATTTATA	TCAAGACAAA	CGAGTTGTAT	GTGTAGCAAA	TGTACTAAAC	AATGTAGATA	3000
CTGCATCAAA	GATAGATTTC	CTGGCAGGAT	TAGTCATAGG	GGTTTCAATG	GACAACGACA	3060
CAAAATTAAAC	ACAGATACAA	AATGAAATGC	TAAACCTCAA	AGCAGATCTA	AAGAAAATGG	3120
ACGAATCACA	TAGAAGATTG	ATAGAAAATC	AAAGAGAACA	ACTGTCATTG	ATCACGTCAC	3180
TAATTTCAAA	TCTCAAAATT	ATGACTGAGA	GAGGAGGAAA	GAAAGACCAA	AATGAATCCA	3240
ATGAGAGAGT	ATCCATGATC	AAAACAAAAT	TGAAAGAAGA	AAAGATCAAG	AAGACCAGGT	3300
TTGACCCACT	TATGGAGGCA	CAAGGCATTG	ACAAGAATAT	ACCCGATCTA	TATCGACATG	3360
CAGGAGATAC	ACTAGAGAAC	GATGTACAAG	TTAAATCAGA	GATATTAAGT	TCATACAATG	3420
AGTCAAATGC	AACAAGACTA	ATACCCAAAA	AAGTGAGCAG	TACAATGAGA	TCACTAGTTG	3480
CAGTCATCAA	CAACAGCAAT	CTCTCACAAA	GCACAAAACA	ATCATACATA	AACGAACTCA	3540
AACGTTGCAA	AAATGATGAA	GAAGTATCTG	AATTAATGGA	CATGTTCAAT	GAAGATGTCA	3600
ACAATTGCCA	ATGATCCAAC	AAAGAAACGA	CACCGAACAA	ACAGACAAGA	AACAACAGTA	3660
GATCAAAACC	TGTCAACACA	CACAAAATCA	AGCAGAATGA	AACAACAGAT	ATCAATCAAT	3720
ATACAAATAA	GAAAAACTTA	GGATTAAAGA	ATAAATTAAT	CCTTGTCCAA	AATGAGTATA	3780
ACTAACTCTG	CAATATACAC	ATTCCCAGAA	TCATCATTCT	CTGAAAATGG	TCATATAGAA	3840
CCATTACCAC	TCAAAGTCAA	TGAACAGAGG	AAAGCAGTAC	CCCACATTAG	AGTTGCCAAG	3900
ATCGGAAATC	CACCAAAACA	CGGATCCCGG	TATTTAGATG	TCTTCTTACT	CGGCTTCTTC	3960
GAGATGGAAC	GAATCAAAGA	CAAATACGGG	AGTGTGAATG	ATCTCGACAG	TGACCCGAGT	4020

TACAAAGTTT	GTGGCTCTGG	ATCATTACCA	ATCGGATTGG	CTAAGTACAC	TGGGAATGAC	4080
CAGGAATTGT	TACAAGCCGC	AACCAAACTG	GATATAGAAG	TGAGAAGAAC	AGTCAAAGCG	4140
AAAGAGATGG	TTGTTTACAC	GGTACAAAAT	ATAAAACCAG	AACTGTACCC	ATGGTCCAAT	4200
AGACTAAGAA	AAGGAATGCT	GTTCGATGCC	AACAAAGTTG	CTCTTGCTCC	TCAATGTCTT	4260
CCACTAGATA	GGAGCATAAA	ATTTAGAGTA	ATCTTCGTGA	ATTGTACGGC	AATTGGATCA	4320
ATAACCTTGT	TCAAAATTCC	TAAGTCAATG	GCATCACTAT	CTCTACCCAA	CACAATATCA	4380
ATCAATCTGC	AGGTACACAT	AAAAACAGGG	GTTCCAGACTG	ATTCTAAAGG	GATAGTTCAA	4440
ATTTTGGATG	AGAAAGGCGA	AAAATCACTG	AATTTTCATGG	TCCATCTCGG	ATTGATCAAA	4500
AGAAAAGTAG	GCAGAATGTA	CTCTGTTGAA	TACTGTAAAC	AGAAAATCGA	GAAAATGAGA	4560
TTGATATTTT	CTTTAGGACT	AGTTGGAGGA	ATCAGTCTTC	ATGTCAATGC	AACTGGGTCC	4620
ATATCAAAAA	CACTAGCAAG	TCAGCTGGTA	TTCAAAAGAG	AGATTTGTTA	TCCTTTAATG	4680
GATCTAAATC	CGCATCTCAA	TCTAGTTATC	TGGGCTTCAT	CAGTAGAGAT	TACAAGAGTG	4740
GATGCAATTT	TCCAACCTTC	TTTACCTGGC	GAGTTCAGAT	ACTATCCTAA	TATTATTGCA	4800
AAAGGAGTTG	GGAAAATCAA	ACAATGGAAC	TAGTAATCTC	TATTTTAGTC	CGGACGTATC	4860
TATTAAGCCG	AAGCAAATAA	AGGATAATCA	AAAACCTTAGG	ACAAAAGAGG	TCAATACCAA	4920
CAACTATTAG	CAGTCACACT	CGCAAGAATA	AGAGAGAAGG	GACCAAAAAA	GTCAAATAGG	4980
AGAAATCAAA	ACAAAAGGTA	CAGAACACCA	GAACAACAAA	ATCAAAACAT	CCAACTCACT	5040
CAAAACAAAA	ATTCCAAAAG	AGACCGGCAA	CACAACAAGC	ACTGAACACA	ATGCCAACTT	5100
CAATACTGCT	AATTATTACA	ACCATGATCA	TGGCATCTTT	CTGCCAAATA	GATATCACAA	5160
AACTACAGCA	CGTAGGTGTA	TTGGTCAACA	GTCCCAAAGG	GATGAAGATA	TCACAAAAC	5220
TTGAAACAAG	ATATCTAATT	TTGAGCCTCA	TACCAAAAAT	AGAAGACTCT	AACTCTTGTC	5280
GTGACCAACA	GATCAAGCAA	TACAAGAAGT	TATTGGATAG	ACTGATCATC	CCTTTATATG	5340
ATGGATTAA	ATTACAGAAA	GATGTGATAG	TAACCAATCA	AGAATCCAAT	GAAAACACTG	5400
ATCCGAGAAC	AAAACGATTC	TTTGGAGGGG	TAATTGGAAC	CATTGCTCTG	GGAGTAGCAA	5460
CCTCAGCACA	AATTACAGCG	GCAGTTGCTC	TGGTTGAAGC	CAAGCAGGCA	AGATCAGACA	5520
TCGAAAAACT	CAAAGAAGCA	ATTAGGGACA	CAAACAAAGC	AGTGCAGTCA	GTTCAGAGCT	5580
CCATAGGAAA	TTTAATAGTA	GCAATTAAAT	CAGTCCAGGA	TTATGTTAAC	AAAGAAATCG	5640
TGCCATCGAT	TGCGAGGCTA	GGTTGTGAAG	CAGCAGGACT	TCAATTAGGA	ATTGCATTAA	5700
CACAGCATTA	CTCAGAATTA	ACAAACATAT	TTGGTGATAA	CATAGGATCG	TTACAAGAAA	5760
AAGGAATAAA	ATTACAAGGT	ATAGCATCAT	TATACCGCAC	AAATATCACA	GAAATATTCA	5820
CAACATCAAC	AGTTGATAAA	TATGATATCT	ATGATCTGTT	ATTTACAGAA	TCAATAAAGG	5880
TGAGAGTTAT	AGATGTTGAC	TTGAATGATT	ACTCAATCAC	CCTCCAAGTC	AGACTCCCTT	5940
TATTAAGTAG	GCTGCTGAAC	ACTCAGATCT	ACAAAGTAGA	TTCCATATCA	TATAACATCC	6000
AAAACAGAGA	ATGGTATATC	CCTCTTCCCA	GCCATATCAT	GACGAAAGGG	GCATTTCTAG	6060
GTGGAGCAGA	GGTCAAAGAA	TGTATAGAAG	CATTACAGCAG	CTATATATGC	CCTTCTGATC	6120

CAGGATTTGT	ATTAAACCAT	GAAATAGAGA	GCTGCTTATC	AGGAAACATA	TCCCAATGTC	6180
CAAGAACAAC	GGTCACATCA	GACATTGTTC	CAAGATATGC	ATTTGTCAAT	GGAGGAGTGG	6240
TTGCAAAC TG	TATAACAACC	ACCTGTACAT	GCAACGGAAT	TGGTAATAGA	ATCAATCAAC	6300
CACCTGATCA	AGGAGTAAAA	ATTATAACAC	ATAAAGAATG	TAGTACAATA	GGTATCAACG	6360
GAATGCTGTT	CAATACAAAT	AAAGAAGGAA	CTCTTGCAAT	CTATACACCA	AATGATATAA	6420
CACTAAACAA	TTCTGTTGCA	CTTGATCCAA	TTGACATATC	AATCGAGCTC	AACAAGGCCA	6480
AATCAGATCT	AGAAGAATCA	AAAGAATGGA	TAAGAAGGTC	AAATCAAAAA	CTAGATTCTA	6540
TTGGAAATTG	GCATCAATCT	AGCACTACAA	TCATAATTAT	TTTGATAATG	ATCATTATAT	6600
TGTTTATAAT	TAATATAACG	ATAATTACAA	TTGCAATTAA	GTATTACAGA	ATTCAAAAAGA	6660
GAAATCGAGT	GGATCAAAAT	GACAAGCCAT	ATGTACTAAC	AAACAAATAA	CATATCTACA	6720
GATCATTAGA	TATTAAAATT	ATAAAAAACT	TAGGAGTAAA	GTTACGCAAT	CCAACTCTAC	6780
TCATATAATT	GAGGAAGGAC	CCAATAGACA	AATCCAAATT	CGAGATGGAA	TACTGGGAAGC	6840
ATACCAATCA	CGGAAAGGAT	GCTGGTAATG	AGCTGGAGAC	GTCTATGGCT	ACTCATGGCA	6900
ACAAGCTCAC	TAATAAGATA	ATATACATAT	TATGGACAAT	AATCCTGGTG	TTATTATCAA	6960
TAGTCTTCAT	CATAGTGCTA	ATTAATTCCA	TCAAAAGTGA	AAAGGCCCCAC	GAATCATTGC	7020
TGCAAGACAT	AAATAATGAG	TTTATGGAAA	TTACAGAAAA	GATCCAAATG	GCATCGGATA	7080
ATACCAATGA	TCTAATACAG	TCAGGAGTGA	ATACAAGGCT	TCTTACAATT	CAGAGTCATG	7140
TCCAGAATTA	CATACCAATA	TCATTGACAC	AACAGATGTC	AGATCTTAGG	AAATTCATTA	7200
GTGAAATTAC	AATTAGAAAT	GATAATCAAG	AAGTGCTGCC	ACAAAGAATA	ACACATGATG	7260
TAGGTATAAA	ACCTTTAAAT	CCAGATGATT	TTTGGAGATG	CACGTCTGGT	CTTCCATCTT	7320
TAATGAAAAC	TCCAAAAATA	AGGTTAATGC	CAGGGCCGGG	ATTATTAGCT	ATGCCAACGA	7380
CTGTGTGATG	CTGTGTTAGA	ACTCCGCTTT	TAGTTATAAA	TGATCTGATT	TATGCTTTATA	7440
CCTCAAATCT	AATTACTCGA	GGTTGTCAGG	ATATAGGAAA	ATCATATCAA	GTCTTACAGA	7500
TAGGGATAAT	AACTGTAAAC	TCAGACTTGG	TACCTGACTT	AAATCCTAGG	ATCTCTCATA	7560
CCTTTAACAT	AAATGACAAT	AGGAAGTCAT	GTTCTCTAGC	ACTCCTAAAT	ATAGATGTAT	7620
ATCAACTGTG	TTCAACTCCC	AAAGTTGATG	AAAGATCAGA	TTATGCATCA	TCAGGCATAG	7680
AAGATATTGT	ACTTGATATT	GTCAATTATG	ATGGTTCAAT	CTCAACAACA	AGATTTAAGA	7740
ATAATAACAT	AAGCTTTGAT	CAACCATATG	CTGCACTATA	CCCATCTGTT	GGACCAGGGA	7800
TATACTACAA	AGGCAAAATA	ATATTTCTCG	GGTATGGAGG	TCTTGAACAT	CCAATAAATG	7860
AGAAATGTAAT	CTGCAACACA	ACTGGGTGCC	CCGGGAAAAC	ACAGAGAGAC	TGTAATCAAG	7920
CATCTCATAG	TACTTGTTTT	TCAGATAGGA	GGATGGTCAA	CTCCATCATT	GTTGTTGACA	7980
AAGGCTTAAA	CTCAATTCCA	AAATTGAAAG	TATGGACGAT	ATCTATGCGA	CAAAATTACT	8040
GGGGGTCAGA	AGGAAGGTTA	CTTCTACTAG	GTAACAAGAT	CTATATATAT	ACAAGATCTA	8100
CAAGTTGGCA	TAGCAAGTTA	CAATTAGGAA	TAATTGATAT	TACTGATTAC	AGTGATATAA	8160
GGATAAAATG	GACATGGCAT	AATGTGCTAT	CAAGACCAGG	AAACAATGAA	TGTCCATGGG	8220

GACATTCATG	TCCAGATGGA	TGTATAACAG	GAGTATATAC	TGATGCATAT	CCACTCAATC	8280
CCACAGGGAG	CATTGTGTCA	TCTGTCATAT	TAGACTCACA	AAAATCGAGA	GTGAACCCAG	8340
TCATAACTTA	CTCAACAGCA	ACCGAAAGAG	TAAACGAGCT	GGCCATCCTA	AACAGAACAC	8400
TCTCAGCTGG	ATATACAACA	ACAAGCTGCA	TTACACACTA	TAACAAAGGA	TATTGTTTTC	8460
ATATAGTAGA	AATAAATCAT	AAAAGCTTAA	ACACATTTCA	ACCCATGTTG	TTCAAAACAG	8520
AGATTCCAAA	AAGCTGCAGT	TAATCATAAT	TAACCATAAT	ATGCATCAAT	CTATCTATAA	8580
TACAAGTATA	TGATAAGTAA	TCAGCAATCA	GACAATAGAC	AAAAGGGAAA	TATAAAAAAC	8640
TTAGGAGCAA	AGCGTGCTCG	GGAAATGGAC	ACTGAATCTA	ACAATGGCAC	TGTATCTGAC	8700
ATACTCTATC	CTGAGTGTCA	CCTTAACCTCT	CCTATCGTTA	AAGGTAAAAT	AGCACAATTA	8760
CACACTATTA	TGAGTCTACC	TCAGCCTTAT	GATATGGATG	ACGACTCAAT	ACTAGTTATC	8820
ACTAGACAGA	AAATAAAACT	TAATAAATTG	GATAAAAGAC	AACGATCTAT	TAGAAGATTA	8880
AAATTAATAT	TAAGTGAATA	AGTGAATGAC	TTAGGAAAAT	ACACATTTAT	CAGATATCCA	8940
GAAATGTCAA	AAGAAATGTT	CAAATTATAT	ATACCTGGTA	TTAACAGTAA	AGTGACTGAA	9000
TTATTACTTA	AAGCAGATAG	AACATATAGT	CAAATGACTG	ATGGATTAAG	AGATCTATGG	9060
ATTAATGTGC	TATCAAAATT	AGCCTCAAAA	AATGATGGAA	GCAATTATGA	TCTTAATGAA	9120
GAAATTAATA	ATATATCGAA	AGTTCACACA	ACCTATAAAT	CAGATAAATG	GTATAATCCA	9180
TTCAAAACAT	GGTTTACTAT	CAAGTATGAT	ATGAGAAGAT	TACAAAAAGC	TCGAAATGAG	9240
ATCACTTTTA	ATGTTGGGAA	GGATTATAAC	TTGTTAGAAG	ACCAGAAGAA	TTTCTTATTG	9300
ATACATCCAG	AATTGGTTTT	GATATTAGAT	AAACAAAAC	ATAATGGTTA	TCTAATTACT	9360
CCTGAATTAG	TATTGATGTA	TTGTGACGTA	GTCGAAGGCC	GATGGAATAT	AAGTGCATGT	9420
GCTAAGTTAG	ATCCAAAATT	ACAATCTATG	TATCAGAAAG	GTAATAACCT	GTGGGAAGTG	9480
ATAGATAAAT	TGTTTCCAAT	TATGGGAGAA	AAGACATTTG	ATGTGATATC	GTTATTAGAA	9540
CCACTTGTCAT	TATCCTTAAT	TCAAATCAT	GATCCTGTTA	AACAATAAG	AGGAGCTTTT	9600
TTAAATCATG	TGTTATCCGA	GATGGAATTA	ATATTTGAAT	CTAGAGAATC	GATTAAGGAA	9660
TTTCTGAGTG	TAGATTACAT	TGATAAAATT	TTAGATATAT	TTAATAAGTC	TACAATAGAT	9720
GAAATAGCAG	AGATTTTCTC	TTTTTTTAGA	ACATTTGGGC	ATCCTCCATT	AGAAGCTAGT	9780
ATTGCAGCAG	AAAAGGTTAG	AAAATATATG	TATATTGGAA	AACAATTAAA	ATTTGACACT	9840
ATTAATAAAT	GTCATGCTAT	CTTCTGTACA	ATAATAATTA	ACGGATATAG	AGAGAGGCAT	9900
GGTGGACAGT	GGCCTCCTGT	GACATTACCT	GATCATGCAC	ACGAATTCAT	CATAAATGCT	9960
TACGGTTCAA	ACTCTGCGAT	ATCATATGAA	AATGCTGTTG	ATTATTACCA	GAGCTTTATA	10020
GGAATAAAAT	TCAATAAATT	CATAGAGCCT	CAGTTAGATG	AGGATTTGAC	AATTTATATG	10080
AAAGATAAAG	CATTATCTCC	AAAAAAATCA	AATTGGGACA	CAGTTTATCC	TGCATCTAAT	10140
TTACTGTACC	GTAATAACGC	ATCCAACGAA	TCACGAAGAT	TAGTTGAAGT	ATTTATAGCA	10200
GATAGTAAAT	TTGATCCTCA	TCAGATATTG	GATTATGTAG	AATCTGGGGA	CTGGTTAGAT	10260
GATCCAGAAT	TTAATATTTT	TTATAGTCTT	AAAGAAAAAG	AGATCAAAAC	GGAAGGTAGA	10320

CTCTTTGCAA	AAATGACATA	CAAAATGAGA	GCTACACAAG	TTTTATCAGA	GACCCTACTT	10380
GCAAATAACA	TAGGAAAATT	CTTTCAAGAA	AATGGGATGG	TGAAGGGAGA	GATTGAATTA	10440
CTTAAGAGAT	TAACAACCAT	ATCAATATCA	GGAGTTCCAC	GGTATAATGA	AGTGACAAAT	10500
AATTCTAAAA	GCCATACAGA	TGACCTTAAA	ACCTACAATA	AAATAAGTAA	TCTTAATTTG	10560
TCTTCTAATC	AGAAATCAAA	GAAATTTGAA	TTCAAGTCAA	CGGATATCTA	CAATGATGGA	10620
TACGAGACTG	TGAGCTGTTT	CCTAACAACA	GATCTCAAAA	AATACTGTCT	TAATTGGAGA	10680
TATGAATCAA	CAGCTCTATT	TGGAGAAACT	TGCAACCAAA	TATTTGGATT	AAATAAATTG	10740
TTTAATTGGT	TACACCCTCG	TCTTGAAGGA	AGTACAATCT	ATGTAGGTGA	TCCTTACTGT	10800
CCTCCATCAG	ATAAAGAACA	TATATCATT	GAGGATCACC	CTGATTCTGG	TTTTTACGTT	10860
CATAACCCAA	GAGGGGGTAT	AGAAGGATTT	TGTCAAAAAT	TATGGACACT	CATATCTATA	10920
AGTGCAATAC	ATCTAGCAGC	TGTTAGAATA	GGCGTGAGGG	TGACTGCAAT	GGTTCAAGGA	10980
GACAATCAAG	CTATAGCTGT	AACCACAAGA	GTACCCAACA	ATTATGACTA	CAGAGTTAAG	11040
AAGGAGATAG	TTTATAAAGA	TGTAGTGAGA	TTTTTTTGATT	CATTAAGAGA	AGTGATGGAT	11100
GATCTAGGTC	ATGAACTTAA	ATTAAATGAA	ACGATTATAA	GTAGCAAGAT	GTTTCATATAT	11160
AGCAAAAGAA	TCTATTATGA	TGGGAGAATT	CTTCCTCAAG	CTCTAAAAGC	ATTATCTAGA	11220
TGTGTCTTCT	GGTCAGAGAC	AGTAATAGAC	GAAACAAGAT	CAGCATCTTC	AAATTTGGCA	11280
ACATCATTTG	CAAAAGCAAT	TGAGAATGGT	TATTCACCTG	TTCTAGGATA	TGCATGCTCA	11340
ATTTTTAAGA	ATATTCAACA	ACTATATATT	GCCCTTGCGA	TGAATATCAA	TCCAACCTATA	11400
ACACAGAATA	TCAGAGATCA	GTATTTTAGG	AATCCAAATT	GGATGCAATA	TGCCTCTTTA	11460
ATACCTGCTA	GTGTTGGGGG	ATTCAATTAC	ATGGCCATGT	CAAGATGTTT	TGTAAGGAAT	11520
ATTGGTGATC	CATCAGTTGC	CGCATTGGCT	GATATTAAAA	GATTTATTAA	GGCGAATCTA	11580
TTAGACCGAA	GTGTTCTTTA	TAGGATTATG	AATCAAGAAC	CAGGTGAGTC	ATCTTTTTTG	11640
GACTGGGCTT	CAGATCCATA	TTCATGCAAT	TTACCACAAT	CTCAAAATAT	AACCACCATG	11700
ATAAAAAATA	TAACAGCAAG	GAATGTATTA	CAAGATTCAC	CAAATCCATT	ATTATCTGGA	11760
TTATTACAA	ATACAATGAT	AGAAGAAGAT	GAAGAATTAG	CTGAGTTCCT	GATGGACAGG	11820
AAGGTAATTC	TCCCTAGAGT	TGCACATGAT	ATTCTAGATA	ATTCTCTCAC	AGGAATTAGA	11880
AATGCCATAG	CTGGAATGTT	AGATACGACA	AAATCACTAA	TTCGGGTTGG	CATAAATAGA	11940
GGAGGACTGA	CATATAGTTT	GTTGAGGAAA	ATCAGTAATT	ACGATCTAGT	ACAATATGAA	12000
ACACTAAGTA	GGACTTTGCG	ACTAATTGTA	AGTGATAAAA	TCAAGTATGA	AGATATGTGT	12060
TCGGTAGACC	TTGCCATAGC	ATTGCGACAA	AAGATGTGGA	TTCATTTATC	AGGAGGAAGG	12120
ATGATAAGTG	GACTTGAAAC	GCCTGACCCA	TTAGAATTAC	TATCTGGGGT	AGTAATAACA	12180
GGATCAGAAC	ATTGTAAAAT	ATGTTATTCT	TCAGATGGCA	CAAACCCATA	TACTTGGATG	12240
TATTTACCCG	GTAATATCAA	AATAGGATCA	GCAGAAACAG	GTATATCGTC	ATTAAGAGTT	12300
CCTTATTTTG	GATCAGTCAC	TGATGAAAGA	TCTGAAGCAC	AATTAGGATA	TATCAAGAAT	12360
CTTAGTAAAC	CTGCAAAAGC	CGCAATAAGA	ATAGCAATGA	TATATACATG	GGCATTTGGT	12420

AATGATGAGA	TATCTTGGAT	GGAAGCCTCA	CAGATAGCAC	AAACACGTGC	AAATTTTACA	12480
CTAGATAGTC	TCAAAATTTT	AACACCGGTA	GCTACATCAA	CAAATTTATC	ACACAGATTA	12540
AAGGATACTG	CAACTCAGAT	GAAATTCTCC	AGTACATCAT	TGATCAGAGT	CAGCAGATTC	12600
ATAACAATGT	CCAATGATAA	CATGTCTATC	AAAGAAGCTA	ATGAAACCAA	AGATACTAAT	12660
CTTATTTATC	AACAAATAAT	GTTAACAGGA	TTAAGTGTTT	TCGAATATTT	ATTTAGATTA	12720
AAAGAAACCA	CAGGACACAA	CCCTATAGTT	ATGCATCTGC	ACATAGAAGA	TGAGTGTTGT	12780
ATTAAGAAA	GTTTTAATGA	TGAACATATT	AATCCAGAGT	CTACATTAGA	ATTAATTCGA	12840
TATCCTGAAA	GTAATGAATT	TATTTATGAT	AAAGACCCAC	TCAAAGATGT	GGACTTATCA	12900
AAACTTATGG	TTATTAAAGA	CCATTCTTAC	ACAATTGATA	TGAATTATTG	GGATGATACT	12960
GACATCATAC	ATGCAATTTT	AATATGTACT	GCAATTACAA	TAGCAGATAC	TATGTCACAA	13020
TTAGATCGAG	ATAATTTAAA	AGAGATAATA	GTTATTGCAA	ATGATGATGA	TATTAATAGC	13080
TTAATCACTG	AATTTTGGAC	TCTTGACATA	CTTGTATTTC	TCAAGACATT	TGGTGGATTA	13140
TTAGTAAATC	AATTTGCATA	CACTCTTTAT	AGTCTAAAAA	TAGAAGGTAG	GGATCTCATT	13200
TGGGATTATA	TAATGAGAAC	ACTGAGAGAT	ACTTCCCAT	CAATATTAAA	AGTATTATCT	13260
AATGCATTAT	CTCATCCTAA	AGTATTCAAG	AGGTTCTGGG	ATTGTGGAGT	TTTAAACCCCT	13320
ATTTATGGTC	CTAATACTGC	TAGTCAAGAC	CAGATAAAAC	TTGCCCTATC	TATATGTGAA	13380
TATTCACTAG	ATCTATTTAT	GAGAGAATGG	TTGAATGGTG	TATCACTTGA	AATATACATT	13440
TGTGACAGCG	ATATGGAAGT	TGCAATGAT	AGGAAACAAG	CCTTTATTTT	TAGACACCTT	13500
TCATTTGTTT	GTTGTTTAGC	AGAAATTGCA	TCTTTCGGAC	CTAACCTGTT	AAACTTAACA	13560
TACTTGAGAG	GACTTGATCT	ATTGAAACAA	TATCTTGAAT	TAAATATTAA	AGAAGACCCCT	13620
ACTCTTAAAT	ATGTACAAAT	ATCTGGATTA	TTAATTAAAT	CGTTCCCATC	AACTGTAACA	13680
TACGTAAGAA	AGACTGCAAT	CAAATATCTA	AGGATTCGCG	GTATTAGTCC	ACCTGAGGTA	13740
ATTGATGATT	GGGATCCGGT	AGAAGATGAA	AATATGCTGG	ATAACATTGT	CAAACTATA	13800
AATGATAACT	GTAATAAAGA	TAATAAAGGG	AATAAAATTA	ACAATTTCTG	GGGACTAGCA	13860
CTTAAGAACT	ATCAAGTCCT	TAAAATCAGA	TCTATAACAA	GTGATTCTGA	TGATAATGAT	13920
AGACTAGATG	CTAATACAAG	TGGTTTGACA	CTTCCTCAAG	GAGGGAATTA	TCTATCGCAT	13980
CAATTGAGAT	TATTCGGAAT	CAACAGCACT	AGTTGTCTGA	AAGCTCTTGA	GTTATCACAA	14040
ATTTTAATGA	AGGAAGTCAA	TAAAGACAAG	GACAGGCTCT	TCCTGGGAGA	AGGAGCAGGA	14100
GCTATGCTAG	CATGTTATGA	TGCCACATTA	GGACCTGCAG	TTAATTATTA	TAATTCAGGT	14160
TTGAATATAA	CAGATGTAAT	TGGTCAACGA	GAATTGAAAA	TATTTCCCTC	AGAGGTATCA	14220
TTAGTAGGTA	AAAAATTAGG	AAATGTGACA	CAGATTCTTA	ACAGGGTAAA	AGTACTGTTC	14280
AATGGGAATC	CTAATTCAAC	ATGGATAGGA	AATATGGAAT	GTGAGAGCTT	AATATGGAGT	14340
GAATTAAATG	ATAAGTCCAT	TGGATTAGTA	CATTGTGATA	TGGAAGGAGC	TATCGGTAAA	14400
TCAGAAGAAA	CTGTTCTACA	TGAACATTAT	AGTGTTATAA	GAATTACATA	CTTGATTGGG	14460
GATGATGATG	TTGTTTTAGT	TTCCAAAATT	ATACCTACAA	TCACTCCGAA	TTGGTCTAGA	14520

ATACTTTATC TATATAAATT ATATTGGAAA GATGTAAGTA TAATATCACT CAAAACCTTCT 14580
 AATCCTGCAT CAACAGAATT ATATCTAATT TCGAAAGATG CATATTGTAC TATAATGGAA 14640
 CCTAGTGAAA TTGTTTTATC AAAACTTAAA AGATTGTCAC TCTTGAAGA AAATAATCTA 14700
 TTAAAATGGA TCATTTTATC AAAGAAGAGG AATAATGAAT GGTTACATCA TGAAATCAAA 14760
 GAAGGAGAAA GAGATTATGG AATCATGAGA CCATATCATA TGGCACTACA AATCTTTGGA 14820
 TTTCAAATCA ATTTAAATCA TCTGGCGAAA GAATTTTTAT CAACCCAGA TCTGACTAAT 14880
 ATCAACAATA TAATCCAAAG TTTTCAGCGA ACAATAAAGG ATGTTTTATT TGAATGGATT 14940
 AATATAACTC ATGATGATAA GAGACATAAA TTAGGCGGAA GATATAACAT ATTCCCACTG 15000
 AAAAATAAGG GAAAGTTAAG ACTGCTATCG AGAAGACTAG TATTAAGTTG GATTTCATTA 15060
 TCATTATCGA CTCGATTACT TACAGGTCGC TTTCTGATG AAAAATTTGA ACATAGAGCA 15120
 CAGACTGGAT ATGTATCATT AGCTGATACT GATTTAGAAT CATTAAAGTT ATTGTGCGAA 15180
 AACATCATT AAGATTACAG AGAGTGATA GGATCAATAT CATATTGGTT TCTAACCAAA 15240
 GAAGTTAAAA TACTTATGAA ATTGATCGGT GGTGCTAAAT TATTAGGAAT TCCCAGACAA 15300
 TATAAAGAAC CCGAAGACCA GTTATTAGAA AACTACAATC AACATGATGA ATTTGATATC 15360
 GATTAAAACA TAAATACAAT GAAGATATAT CCTAACCTTT ATCTTTAAGC CTAGGAATAG 15420
 AAAAAAGTA AGAAAAACAT GTAATATATA TATACCAAAC AGAGTTCTTC TCTTGTTTGG 15480
 TGGGTCGGCA TGGCATCTCC ACCTCCTCGC GGTCCGGACC TGGGCATCCG AAGGAGGACG 15540
 CACGTCCACT CGGATGGCTA AGGGAGAGCC TGCAGTAGCA TAACCCCTTG GGGCCTCTAA 15600
 ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT TGCTGAAAGG AGGAACTATA TACGCGTCGA CGGGCCCCGC 15660
 GCTCAC 15666

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 16:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 16:
 15 GGATTGCGC GCAATTTAAA TCATCTGG 28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 17:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 70 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 17:

CCCAGGTCGG ACCGCGAGGA GGTGGAGATG CCATGCCAGC CCACCAAAC AAGAGAAGAA 60
CTCTGTTTGG 70

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 18:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 18:

GGCCCGTCGA CGCGTAATAC GACTCACTAT AGGACCAAAC AAGAG 45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 19:

CGGCATCAG TGCTAC 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 6843 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 20

ATGTTGAGCC TATTTGATAC ATTTAATGCA CGTAGGCAAG AAAACATAAC AAAATCAGCC 60
GGTGGAGCTA TCATTCCTGG ACAGAAAAAT ACTGTCTCTA TATTCGCCCT TGGACCGACA 120
ATAACTGATG ATAATGAGAA AATGACATTA GCTCTTCTAT TTCTATCTCA TTCACTAGAT 180
AATGAGAAAC AACATGCACA AAGGGCAGGG TTCTTGGTGT CTTTATTGTC AATGGCTTAT 240
GCCAATCCAG AGCTCTACCT AACAACAAAT GGAAGTAATG CAGATGTCAA GTATGTCATA 300
TACATGATTG AGAAAGATCT AAAACGGCAA AAGTATGGAG GATTTGTGGT TAAGACGAGA 360
GAGATGATAT ATGAAAAGAC AACTGATTGG ATATTTGGAA GTGACCTGGA TTATGATCAG 420
GAAACTATGT TGCAGAACGG CAGGAACAAT TCAACAATTG AAGACCTTGT CCACACATTT 480
GGGTATCCAT CATGTTTAGG AGCTCTTATA ATACAGATCT GGATAGTTCT GGTCAAAGCT 540

ATCACTAGTA TCTCAGGGTT AAGAAAAGGC TTTTTCACCC GATTGGAAGC TTTCAGACAA	600
GATGGAACAG TGCAGGCAGG GCTGGTATTG AGCGGTGACA CAGTGGATCA GATTGGGTCA	660
ATCATGCGGT CTCAACAGAG CTTGGTAACCT CTTATGGTTG AAACATTAAT AACAAATGAAT	720
ACCAGCAGAA ATGACCTCAC AACCATAGAA AAGAATATAC AAATTGTTGG CAACTACATA	780
AGAGATGCAG GTCTCGCTTC ATTCTTCAAT ACAATCAGAT ATGGAATTGA GACCAGAATG	840
GCAGCTTTGA CTCTATCCAC TCTCAGACCA GATATCAATA GATTAAAAGC TTTGATGGAA	900
CTGTATTTAT CAAAGGGACC ACGCGCTCCT TTCATCTGTA TCCTCAGAGA TCCTATACAT	960
GGTGAGTTCG CACCAGGCAA CTATCCTGCC ATATGGAGCT ATGCAATGGG GGTGGCAGTT	1020
GTACAAAATA GAGCCATGCA ACAGTATGTG ACGGGAAGAT CATATCTAGA CATTGATATG	1080
TTCCAGCTAG GACAAGCAGT AGCACGTGAT GCCGAAGCTC AAATGAGCTC AACACTGGAA	1140
GATGAACTTG GAGTGACACA CGAATCTAAA GAAAGCTTGA AGAGACATAT AAGGAACATA	1200
AACAGTTCAG AGACATCTTT CCACAAACCG ACAGGTGGAT CAGCCATAGA GATGGCAATA	1260
GATGAAGAGC CAGAACAATT CGAACATAGA GCAGATCAAG AACAAAATGG AGAACCTCAA	1320
TCATCCATAA TTCAATATGC CTGGGCAGAA GGAAATAGAA GCGATGATCA GACTGAGCAA	1380
GCTACAGAAT CTGACAATAT CAAGACCGAA CAACAAAACA TCAGAGACAG ACTAAACAAG	1440
AGACTCAACG ACAAGAAGAA ACAAAGCAGT CAACCACCCA CTAATCCCAC AAACAGAACA	1500
AACCAGGACG AAATAGATGA TCTGTTTAAC GCATTTGGAA GCAACTAAGT CGACGATCCG	1560
GCTGCTAACA AAGCCCGAAA GGAAGCTGAG TTGGCTGCTG CCACCGCTGA GCAATAACTA	1620
GCATAACCCC TTGGGGCCTC TAAACGGGTC TTGAGGGGTT TTTTGCTGAA AGGAGGAACT	1680
ATATCCGGAT CGAGATCAAT TCTGTGAGCG TATGGCAAAC GAAGGAAAAA TAGTTATAGT	1740
AGCCGCACTC GATGGGACAT TTCAACGTAA ACCGTTTAAT AATATTTTGA ATCTTATTC	1800
ATTATCTGAA ATGGTGGTAA AACTAACTGC TGTGTGTATG AAATGCTTTA AGGAGGCTTC	1860
CTTTTCTAAA CGATTGGGTG AGGAAACCGA GATAGAAATA ATAGGAGGTA ATGATATGTA	1920
TCAATCGGTG TGTAAGAAAT GTTACATCGA CTCATAATAT TATATTTTTT ATCTAAAAAA	1980
CTAAAAATAA ACATTGATTA AATTTTAATA TAATACTTAA AAATGGATGT TGTGTCTGTA	2040
GATAAACCGT TTATGTATTT TGAGGAAATT GATAATGAGT TAGATTACGA ACCAGAAAGT	2100
GCAATGAGG TCGCAAAAAA ACTGCCGTAT CAAGGACAGT TAAACTATT ACTAGGAGAA	2160
TTATTTTTTC TTAGTAAGTT ACAGCGACAC GGTATATTAG ATGGTGCCAC CGTAGTGTAT	2220
ATAGGATCTG CTCCCGGTAC ACATATACGT TATTTGAGAG ATCATTCTTA TAATTTAGGA	2280
GTGATCATCA AATGGATGCT AATTGACGGC CGCCATCATG ATCCTATTTT AAATGGATTG	2340
CGTGATGTGA CTCTAGTGAC TCGGTTCGTT GATGAGGAAT ATCTACGATC CATCAAAAAA	2400
CAACTGCATC CTTCTAAGAT TATTTTAATT TCTGATGTGA GATCCAAACG AGGAGGAAAT	2460
GAACCTAGTA CGGCGGATTT ACTAAGTAAT TACGCTCTAC AAAATGTCAT GATTAGTATT	2520
TTAAACCGCG TGGCGTCTAG TCTTAAATGG AGATGCCCGT TTCCAGATCA ATGGATCAAG	2580
GACTTTTATA TCCACACGG TAATAAAATG TTACAACCTT TTGCTGCTTC ATATTCAGGG	2640

CCGTCGTTTT	ACAACGTCGT	GACTGGGAAA	ACCCTGGCGT	TACCCAACTT	AATCGCCTTG	2700
CAGCACATCC	CCCTTTCGCC	AGCTGGCGTA	ATAGCGAAGA	GGCCCGCACC	GATCGCCCTT	2760
CCCAACAGTT	GCGCAGCCTG	AATGGCGAAT	GGCGCGACGC	GCCCTGTAGC	GGCGCATTAA	2820
GCGCGGCGGG	TGTGGTGGTT	ACGCGCAGCG	TGACCGCTAC	ACTTGCCAGC	GCCCTAGCGC	2880
CCGCTCCTTT	CGCTTCTTTC	CCTTCCTTTC	TCGCCACGTT	CGCCGGCTTT	CCCCGTCAAG	2940
CTCTAAATCG	GGGGCTCCCT	TTAGGGTTCC	GATTTAGTGC	TTTACGGCAC	CTCGACCCCA	3000
AAAAACTTGA	TTAGGGTGAT	GGTTCACGTA	GTGGGCCATC	GCCCTGATAG	ACGGTTTTTTC	3060
GCCCTTTGAC	GTGGAGTCC	ACGTTCTTTA	ATAGTGGACT	CTTGTTCCAA	ACTGGAACAA	3120
CACTCAACCC	TATCTCGGTC	TATTCTTTTG	ATTTATAAGG	GATTTTGCCG	ATTTGCGCCT	3180
ATTGGTTAAA	AAATGAGCTG	ATTTAACAAA	AATTTAACGC	GAATTTTAAC	AAAATATTAA	3240
CGTTTACAAT	TTCCCAGGTG	GCACTTTTCG	GGGAAATGTG	CGCGGAACCC	CTATTTGTTT	3300
ATTTTTCTAA	ATACATTCAA	ATATGTATCC	GCTCATGAGA	CAATAACCCT	GATAAATGCT	3360
TCAATAATAT	TGAAAAAGGA	AGAGTATGAG	TATTCAACAT	TTCCGTGTCT	CCCTTATTCC	3420
CTTTTTTGCG	GCATTTTGCC	TTCCTGTTTT	TGCTCACCCA	GAAACGCTGG	TGAAAGTAAA	3480
AGATGCTGAA	GATCAGTTGG	GTGCACGAGT	GGGTTACATC	GAACTGGATC	TCAACAGCGG	3540
TAAGATCCTT	GAGAGTTTTC	GCCCCGAAGA	ACGTTTTCCA	ATGATGAGCA	CTTTTAAAGT	3600
TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT	TATCCCGTAT	TGACGCCGGG	CAAGAGCAAC	TCGGTCGCCG	3660
CATACACTAT	TCTCAGAATG	ACTTGGTGTA	GTACTCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC	3720
GGATGGCATG	ACAGTAAGAG	AATTATGCAG	TGCTGCCATA	ACCATGAGTG	ATAACACTGC	3780
GGCCAACTTA	CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG	CTAACCGCTT	TTTTGCACAA	3840
CATGGGGGAT	CATGTAATC	GCCTTGATCG	TTGGGAACCG	GAGCTGAATG	AAGCCATACC	3900
AAACGACGAG	CGTGACACCA	CGATGCCTGT	AGCAATGGCA	ACAACGTTGC	GCAAACTATT	3960
AACTGGCGAA	CTACTTACTC	TAGCTTCCCG	GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGGCGGA	4020
TAAAGTTGCA	GGACCACTTC	TGCGCTCGGC	CTTCCGGCT	GGCTGGTTTA	TTGCTGATAA	4080
ATCTGGAGCC	GGTGAGCGTG	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA	GCACTGGGGC	CAGATGGTAA	4140
GCCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC	GGGGAGTCAG	GCAACTATGG	ATGAACGAAA	4200
TAGACAGATC	GCTGAGATAG	GTGCCTCACT	GATTAAGCAT	TGGTAACTGT	CAGACCAAGT	4260
TTACTCATAT	ATACTTTAGA	TTGATTTAAA	ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT	4320
GAAGATCCTT	TTTGATAATC	TCATGACCAA	AATCCCTTAA	CGTGAGTTTT	CGTTCCACTG	4380
AGCGTCAGAC	CCCGTAGAAA	AGATCAAAGG	ATCTTCTTGA	GATCCTTTTT	TTCTGCGCGT	4440
AATCTGCTGC	TTGCAAACAA	AAAAACCACC	GCTACCAGCG	GTGGTTTGTT	TGCCGGATCA	4500
AGAGCTACCA	ACTCTTTTTC	CGAAGGTAAC	TGGCTTCAGC	AGAGCGCAGA	TACCAAATAC	4560
TGTCCTTCTA	GTGTAGCCGT	AGTTAGGCCA	CCACTTCAAG	AACTCTGTAG	CACCGCCTAC	4620
ATACCTCGCT	CTGCTAATCC	TGTTACCAGT	GGCTGCTGCC	AGTGGCGATA	AGTCGTGTCT	4680
TACCGGGTTG	GACTCAAGAC	GATAGTTACC	GGATAAGGCG	CAGCGGTCGG	GCTGAACGGG	4740

GGGTTCTGTC	ACACAGCCCA	GCTTGGAGCG	AACGACCTAC	ACCGAACTGA	GATACCTACA	4800
GCGTGAGCTA	TGAGAAAGCG	CCACGCTTCC	CGAAGGGAGA	AAGGCGGACA	GGTATCCGGT	4860
AAGCGGCAGG	GTCGGAACAG	GAGAGCGCAC	GAGGGAGCTT	CCAGGGGGAA	ACGCCTGGTA	4920
TCTTTATAGT	CCTGTCGGGT	TTCGCCACCT	CTGACTTGAG	CGTCGATTTT	TGTGATGCTC	4980
GTCAGGGGGG	CGGAGCCTAT	GGAAAAACGC	CAGCAACGCG	GCCTTTTTTAC	GGTTCCTGGC	5040
CTTTTGCTGG	CCTTTTGCTC	ACATGTTCTT	TCCTGCGTTA	TCCCCTGATT	CTGTGGATAA	5100
CCGTATTACC	GCCTTTGAGT	GAGCTGATAC	CGCTCGCCGC	AGCCGAACGA	CCGAGCGCAG	5160
CGAGTCAGTG	AGCGAGGAAG	CGGAAGAGCG	CCCAATACGC	AAACCGCCTC	TCCCCGCGCG	5220
TTGGCCGATT	CATTAATGCA	GCTGGCACGA	CAGGTTTCCC	GACTGGAAAG	CGGGCAGTGA	5280
GCGCAACGCA	ATTAATGTGA	GTTAGCTCAC	TCATTAGGCA	CCCCAGGCTT	TACACTTTAT	5340
GCTTCCGGCT	CGTATGTTGT	GTGGAATTGT	GAGCGGATAA	CAATTTACA	CAGGAAACAG	5400
CTATGACCAT	GATTACGCCA	AGCTTTTGCG	ATCAATAAAT	GGATCACAAC	CAGTATCTCT	5460
TAACGATGTT	CTTCGCAGAT	GATGATTCAT	TTTTTAAGTA	TTTGGCTAGT	CAAGATGATG	5520
AATCTTCATT	ATCTGATATA	TTGCAAATCA	CTCAATATCT	AGACTTTCTG	TTATTATTAT	5580
TGATCCAATC	AAAAAATAAA	TTAGAAGCCG	TGGGTCATTG	TTATGAATCT	CTTTCAGAGG	5640
AATACAGACA	ATTGACAAAA	TTCACAGACT	TTCAAGATTT	TAAAAAACTG	TTTAACAAGG	5700
TCCCTATTGT	TACAGATGGA	AGGGTCAAAC	TTAATAAAGG	ATATTTGTTC	GACTTTGTGA	5760
TTAGTTTGAT	GCGATTCAAA	AAAGAATCCT	CTCTAGCTAC	CACCGCAATA	GATCCTGTTA	5820
GATACATAGA	TCCTCGTCGC	AATATCGCAT	TTTCTAACGT	GATGGATATA	TTAAAGTCGA	5880
ATAAAGTGAA	CAATAATTAA	TTCTTTATTG	TCATCATGAA	CGGCGGACAT	ATTCAGTTGA	5940
TAATCGGCCC	CATGTTTTCA	GGTAAAAGTA	CAGAATTAAT	TAGACGAGTT	AGACGTTATC	6000
AAATAGCTCA	ATATAAATGC	GTGACTATAA	AATATTCTAA	CGATAATAGA	TACGGAACGG	6060
GACTATGGAC	GCATGATAAG	AATAATTTTG	AAGCATTGGA	AGCAACTAAA	CTATGTGATG	6120
TCTTGGAATC	AATTACAGAT	TTCTCCGTGA	TAGGTATCGA	TGAAGGACAG	TTCTTTCCAG	6180
ACATTGTTGA	ATTGATCTCG	ATCCCGCGAA	ATTAATACGA	CTCACTATAG	GGAGACCACA	6240
ACGGTTTCCC	TCTAGCGGGA	TCAATTCCGC	CCCTCTCCCT	CCCCCCCCC	TAACGTTACT	6300
GGCCGAAGCC	GCTTGGAAATA	AGGCCGGTGT	GCGTTTGTCT	ATATGTTATT	TTCCACCATA	6360
TTGCCGTCTT	TTGGCAATGT	GAGGGCCCCG	AAACCTGGCC	CTGTCTTCTT	GACGAGCATT	6420
CCTAGGGGTC	TTTCCCCTCT	CGCCAAAGGA	ATGCAAGGTC	TGTTGAATGT	CGTGAAGGAA	6480
GCAGTTCCTC	TGGAAGCTTC	TTGAAGACAA	ACAACGTCTG	TAGCGACCCT	TTGCAGGCAG	6540
CGGAACCCCC	CACCTGGCGA	CAGGTGCCCTC	TGCGGCCAAA	AGCCACGTGT	ATAAGATACA	6600
CCTGCAAAGG	CGGCACAACC	CCAGTGCCAC	GTTGTGAGTT	GGATAGTTGT	GGAAAGAGTC	6660
AAATGGCTCT	CCTCAAGCGT	ATTCAACAAG	GGGCTGAAGG	ATGCCCAGAA	GGTACCCCAT	6720
TGTATGGGAT	CTGATCTGGG	GCCTCGGTGC	ACATGCTTTA	CATGTGTTTA	GTCGAGGTTA	6780
AAAAACGTCT	AGGCCCCCCG	AACCACGGGG	ACGTGGTTTT	CCTTTGAAAA	ACACGATAAT	6840
ACC						6843

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7107 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 21:

```

ATGGAAGCG ACGCTAAAA CTATCAAATC ATGGATTCTT GGGAAGAGGA ATCAAGAGAT      60
AAATCAACTA ATATCTCCTC GGCCCTCAAC ATCATTGAAT TCATACTCAG CACCGACCCC      120
CAAGAAGACT TATCGGAAAA CGACACAATC AACACAAGAA CCCAGCAACT CAGTGCCACC      180
ATCTGTCAAC CAGAAATCAA ACCAACAGAA ACAAGTGAGA AAGATAGTGG ATCAACTGAC      240
AAAAATAGAC AGTCCGGGTC ATCACACGAA TGTACAACAG AAGCAAAAGA TAGAAATATT      300
GATCAGGAAA CTGTACAGAG AGGACCTGGG AGAAGAAGCA GCTCAGATAG TAGAGCTGAG      360
ACTGTGGTCT CTGGAGGAAT CCCAGAAGC ATCACAGATT CTAAAAATGG AACCCAAAAC      420
ACGGAGGATA TTGATCTCAA TGAAATTAGA AAGATGGATA AGGACTCTAT TGAGGGGAAA      480
ATGCGACAAT CTGCAAATGT TCCAAGCGAG ATATCAGGAA GTGATGACAT ATTTACAACA      540
GAACAAAGTA GAAACAGTGA TCATGGAAGA AGCCTGGAAT CTATCAGTAC ACCTGATACA      600
AGATCAATAA GTGTTGTTAC TGCTGCAACA CCAGATGATG AAGAAGAAAT ACTAATGAAA      660
AATAGTAGGA CAAAGAAAAG TTCTTCAACA CATCAAGAAG ATGACAAAAG AATTAAAAAA      720
GGGGGAAAAG GGAAAGACTG GTTTAAGAAA TCAAAGATA CCGACAACCA GATACCAACA      780
TCAGACTACA GATCCACATC AAAAGGGCAG AAGAAAATCT CAAAGACAAC AACCACCAAC      840
ACCGACACAA AGGGGCAAAC AGAAATACAG ACAGAATCAT CAGAAACACA ATCCTCATCA      900
TGGAATCTCA TCATCGACAA CAACCCGAC CGGAACGAAC AGACAAGCAC AACTCCTCCA      960
ACAACAACTT CCAGATCAAC TTATACAAAA GAATCGATCC GAACAACTC TGAATCCAAA     1020
CCCAAGACAC AAAAGACAAA TGGAAAGGAA AGGAAGGATA CAGAAGAGAG CAATCGATTT     1080
ACAGAGAGGG CAATTACTCT ATTGCAGAAT CTTGGTGTA TCAATCCAC ATCAAAACTA     1140
GATTTATATC AAGACAAACG AGTTGTATGT GTAGCAAATG TACTAAACAA TGTAGATACT     1200
GCATCAAAGA TAGATTTCTT GGCAGGATTA GTCATAGGGG TTTCAATGGA CAACGACACA     1260
AAATTAACAC AGATACAAAA TGAAATGCTA AACCTCAAAG CAGATCTAAA GAAAATGGAC     1320
GAATCACATA GAAGATTGAT AGAAAATCAA AGAGAACAAC TGTCAATGAT CACGTCACATA     1380
ATTTCAAATC TCAAAATTAT GACTGAGAGA GGAGGAAAGA AAGACCAAAA TGAATCCAAT     1440
GAGAGAGTAT CCATGATCAA AACAAAATTG AAAGAAGAAA AGATCAAGAA GACCAGGTTT     1500
GACCCACTTA TGGAGGCACA AGGCATTGAC AAGAATATAC CCGATCTATA TCGACATGCA     1560
GGAGATACAC TAGAGAACGA TGTACAAGTT AAATCAGAGA TATTAAGTTC ATACAATGAG     1620

```


TCAAATGCAA	CAAGACTAAT	ACCCAAAAAA	GTGAGCAGTA	CAATGAGATC	ACTAGTTGCA	1680
GTCATCAACA	ACAGCAATCT	CTCACAAAGC	ACAAAACAAT	CATACATAAA	CGAACTCAAA	1740
CGTTGCAAAA	ATGATGAAGA	AGTATCTGAA	TTAATGGACA	TGTTCAATGA	AGATGTCAAC	1800
AATTGCCAAT	GAGTCGACGA	TCCGGCTGCT	AACAAAGCCC	GAAAGGAAGC	TGAGTTGGCT	1860
GCTGCCACCG	CTGAGCAATA	ACTAGCATAA	CCCCTTGGGG	CCTCTAAACG	GGTCTTGAGG	1920
GGTTTTTTGC	TGAAAGGAGG	AACTATATCC	GGATCGAGAT	CAATTCTGTG	AGCGTATGGC	1980
AAACGAAGGA	AAAATAGTTA	TAGTAGCCGC	ACTCGATGGG	ACATTTCAAC	GTAAACCGTT	2040
TAATAATATT	TTGAATCTTA	TTCCATTATC	TGAAATGGTG	GTAAACTAA	CTGCTGTGTG	2100
TATGAAATGC	TTTAAGGAGG	CTTCCTTTTC	TAAACGATTG	GGTGAGGAAA	CCGAGATAGA	2160
AATAATAGGA	GGTAATGATA	TGTATCAATC	GGTGTGTAGA	AAGTGTTACA	TCGACTCATA	2220
ATATTATATT	TTTTATCTAA	AAAACATAAA	ATAAACATTG	ATTAAATTTT	AATATAATAC	2280
TTAAAAATGG	ATGTTGTGTC	GTTAGATAAA	CCGTTTATGT	ATTTTGAGGA	AATTGATAAT	2340
GAGTTAGATT	ACGAACCAGA	AAGTGCAAAT	GAGGTCGCAA	AAAAACTGCC	GTATCAAGGA	2400
CAGTTAAAAC	TATTACTAGG	AGAATTATTT	TTTCTTAGTA	AGTTACAGCG	ACACGGTATA	2460
TTAGATGGTG	CCACCGTAGT	GTATATAGGA	TCTGCTCCCG	GTACACATAT	ACGTTATTTG	2520
AGAGATCATT	TCTATAATTT	AGGAGTGATC	ATCAAATGGA	TGCTAATTGA	CGGCCGCCAT	2580
CATGATCCTA	TTTTAAATGG	ATTGCGTGAT	GTGACTCTAG	TGACTCGGTT	CGTTGATGAG	2640
GAATATCTAC	GATCCATCAA	AAAACAACCT	CATCCTTCTA	AGATTATTTT	AATTTCTGAT	2700
GTGAGATCCA	AACGAGGAGG	AAATGAACCT	AGTACGGCGG	ATTTACTAAG	TAATTACGCT	2760
CTACAAAATG	TCATGATTAG	TATTTTAAAC	CCCGTGGCGT	CTAGTCTTAA	ATGGAGATGC	2820
CCGTTTCCAG	ATCAATGGAT	CAAGGACTTT	TATATCCCAC	ACGGTAATAA	AATGTTACAA	2880
CCTTTTGCTC	CTTCATATTC	AGGGCCGTCG	TTTTACAACG	TCGTGACTGG	GAAAACCTTG	2940
GCGTTACCCA	ACTTAATCGC	CTTGCAGCAC	ATCCCCCTTT	CGCCAGCTGG	CGTAATAGCG	3000
AAGAGGCCCG	CACCGATCGC	CCTTCCCAAC	AGTTGCGCAG	CCTGAATGGC	GAATGGCGCG	3060
ACGCGCCCTG	TAGCGGCGCA	TTAAGCGCGG	CGGGTGTGGT	GGTTACGCGC	AGCGTGACCG	3120
CTACACTTGC	CAGCGCCCTA	GCGCCCGCTC	CTTTCGCTTT	CTTCCCTTCC	TTTCTCGCCA	3180
CGTTCGCCGG	CTTCCCCCGT	CAAGCTCTAA	ATCGGGGGCT	CCCTTTAGGG	TTCCGATTTA	3240
GTGCTTTACG	GCACCTCGAC	CCCAAAAAAC	TTGATTAGGG	TGATGGTTCA	CGTAGTGGGC	3300
CATCGCCCTG	ATAGACGGTT	TTTCGCCCTT	TGACGTTGGA	GTCCACGTTT	TTTAATAGTG	3360
GACTCTTGTT	CCAAACTGGA	ACAACACTCA	ACCTATCTC	GGTCTATTCT	TTTGATTTAT	3420
AAGGGATTTT	GCCGATTTTC	GCCTATTGGT	TAAAAAATGA	GCTGATTTAA	CAAAAATTTA	3480
ACGCGAATTT	TAACAAAATA	TTAACGTTTA	CAATTTCCCA	GGTGGCACTT	TTGGGGGAAA	3540
TGTGCGCGGA	ACCCCTATTT	GTTTATTTTT	CTAAATACAT	TCAAATATGT	ATCCGCTCAT	3600
GAGACAATAA	CCCTGATAAA	TGCTTCAATA	ATATTGAAAA	AGGAAGAGTA	TGAGTATTCA	3660
ACATTTCCGT	GTGCGCCTTA	TTCCCTTTTT	TGGGGCATTT	TGCCTTCCTG	TTTTTGCTCA	3720

CCCAGAAACG	CTGGTGAAAG	TAAAAGATGC	TGAAGATCAG	TTGGGTGCAC	GAGTGGGTTA	3780
CATCGAACTG	GATCTCAACA	GCGGTAAGAT	CCTTGAGAGT	TTTCGCCCCG	AAGAACGTTT	3840
TCCAATGATG	AGCACTTTTA	AAGTTCTGCT	ATGTGGCGCG	GTATTATCCC	GTATTGACGC	3900
CGGGCAAGAG	CAACTCGGTC	GCCGCATACA	CTATTCTCAG	AATGACTTGG	TTGAGTACTC	3960
ACCAGTCACA	GAAAAGCATC	TTACGGATGG	CATGACAGTA	AGAGAATTAT	GCAGTGCTGC	4020
CATAACCATG	AGTGATAACA	CTGCGGCCAA	CTTACTTCTG	ACAACGATCG	GAGGACCGAA	4080
GGAGCTAACC	GCTTTTGTGC	ACAACATGGG	GGATCATGTA	ACTCGCCTTG	ATCGTTGGGA	4140
ACCGGAGCTG	AATGAAGCCA	TACCAAACGA	CGAGCGTGAC	ACCACGATGC	CTGTAGCAAT	4200
GGCAACAACG	TTGCGCAAAC	TATTAACCTG	CGAACTACTT	ACTCTAGCTT	CCCGGCAACA	4260
ATTAATAGAC	TGGATGGAGG	CGGATAAAGT	TGCAGGACCA	CTTCTGCGCT	CGGCCCTTCC	4320
GGCTGGCTGG	TTTATTGCTG	ATAAATCTGG	AGCCGGTGAG	CGTGGGTCTC	GCGGTATCAT	4380
TGCAGCACTG	GGGCCAGATG	GTAAGCCCTC	CCGTATCGTA	GTTATCTACA	CGACGGGGAG	4440
TCAGGCAACT	ATGGATGAAC	GAAATAGACA	GATCGCTGAG	ATAGGTGCCT	CACTGATTAA	4500
GCATTGGTAA	CTGTCAGACC	AAGTTTACTC	ATATATACTT	TAGATTGATT	TAAAACTTCA	4560
TTTTTAATTT	AAAAGGATCT	AGGTGAAGAT	CCTTTTTGAT	AATCTCATGA	CCAAAATCCC	4620
TTAACGTGAG	TTTTCGTTCC	ACTGAGCGTC	AGACCCCGTA	GAAAAGATCA	AAGGATCTTC	4680
TTGAGATCCT	TTTTTCTGTC	GCGTAATCTG	CTGCTTGCAA	ACAAAAAAC	CACCGCTACC	4740
AGCGGTGGTT	TGTTTGCCGG	ATCAAGAGCT	ACCAACTCTT	TTTCCGAAGG	TAACTGGCTT	4800
CAGCAGAGCG	CAGATACCAA	ATACTGTCCT	TCTAGTGTAG	CCGTAGTTAG	GCCACCACTT	4860
CAAGAACTCT	GTAGCACC GC	CTACATACCT	CGCTCTGCTA	ATCCTGTTAC	CAGTGGCTGC	4920
TGCCAGTGGC	GATAAGTCGT	GTCTTACCGG	GTTGGACTCA	AGACGATAGT	TACCGGATAA	4980
GGCGCAGCGG	TCGGGCTGAA	CGGGGGGTTT	GTGCACACAG	CCCAGCTTGG	AGCGAACGAC	5040
CTACACCGAA	CTGAGATACC	TACAGCGTGA	GCTATGAGAA	AGCGCCACGC	TTCCCGAAGG	5100
GAGAAAGGCG	GACAGGTATC	CGGTAAGCGG	CAGGGTCGGA	ACAGGAGAGC	GCACGAGGGA	5160
GCTTCCAGGG	GGAAACGCCT	GGTATCTTTA	TAGTCCTGTC	GGGTTTCGCC	ACCTCTGACT	5220
TGAGCGTCGA	TTTTTGTGAT	GCTCGTCAGG	GGGGCGGAGC	CTATGGAAAA	ACGCCAGCAA	5280
CGCGGCCTTT	TTACGGTTCC	TGGCCTTTTG	CTGGCCTTTT	GCTCACATGT	TCTTTCCTGC	5340
GTTATCCCTT	GATTCTGTGG	ATAACCGTAT	TACCGCCTTT	GAGTGAGCTG	ATACCGCTCG	5400
CCGCAGCCGA	ACGACCGAGC	GCAGCGAGTC	AGTGAGCGAG	GAAGCGGAAG	AGCGCCCAAT	5460
AGGCAAACCG	CCTCTCCCCG	CGCGTTGGCC	GATTCATTAA	TGCAGCTGGC	ACGACAGGTT	5520
TCCCGACTGG	AAAGCGGGCA	GTGAGCGCAA	CGCAATTAAT	GTGAGTTAGC	TCACTCATT A	5580
GGCACCCAG	GCTTTACACT	TTATGCTTCC	GGCTCGTATG	TTGTGTGGAA	TTGTGAGCGG	5640
ATAACAATTT	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTTT	TGCGATCAAT	5700
AAATGGATCA	CAACCAGTAT	CTCTTAACGA	TGTTCTTGGC	AGATGATGAT	TCATTTTTTA	5760
AGTATTTGGC	TAGTCAAGAT	GATGAATCTT	CATTATCTGA	TATATTGCAA	ATCACTCAAT	5820

ATCTAGACTT	TCTGTTATTA	TTATTGATCC	AATCAAAAAA	TAAATTAGAA	GCCGTGGGTC	5880
ATTGTTATGA	ATCTCTTTCA	GAGGAATACA	GACAATTGAC	AAAATTCACA	GACTTTCAAG	5940
ATTTTAAAAA	ACTGTTTAAAC	AAGGTCCTTA	TTGTTACAGA	TGGAAGGGTC	AAACTTAATA	6000
AAGGATATTT	GTTGACTTTT	GTGATTAGTT	TGATGCGATT	CAAAAAAGAA	TCCTCTCTAG	6060
CTACCACCGC	AATAGATCCT	GTTAGATACA	TAGATCCTCG	TCGCAATATC	GCATTTTCTA	6120
ACGTGATGGA	TATATTAAAG	TCGAATAAAG	TGAACAATAA	TTAATTCTTT	ATTGTCATCA	6180
TGAACGGCGG	ACATATTCAG	TTGATAATCG	GCCCCATGTT	TTCAGGTAA	AGTACAGAAT	6240
TAATTAGACG	AGTTAGACGT	TATCAAATAG	CTCAATATAA	ATGCGTGACT	ATAAAATATT	6300
CTAACGATAA	TAGATACGGA	ACGGGACTAT	GGACGCATGA	TAAGAATAAT	TTTGAAGCAT	6360
TGGAAGCAAC	TAAACTATGT	GATGCTTTGG	AATCAATTAC	AGATTTCCTC	GTGATAGGTA	6420
TCGATGAAGG	ACAGTTCTTT	CCAGACATTG	TTGAATTGAT	CTCGATCCCG	CGAAATTAAT	6480
ACGACTCACT	ATAGGGAGAC	CACAACGGTT	TCCCTCTAGC	GGGATCAATT	CCGCCCTCT	6540
CCCTCCCCCC	CCCCTAACGT	TACTGGCCGA	AGCCGCTTGG	AATAAGGCCG	GTGTGCGTTT	6600
GTCTATATGT	TATTTTCCAC	CATATTGCCG	TCTTTTGGCA	ATGTGAGGGC	CCGGAAACCT	6660
GGCCCTGTCT	TCTTGACGAG	CATTCCTAGG	GGTCTTTCCC	CTCTCGCCAA	AGGAATGCAA	6720
GGTCTGTTGA	ATGTCGTGAA	GGAAGCAGTT	CCTCTGGAAG	CTTCTTGAAG	ACAAACAACG	6780
TCTGTAGCGA	CCCTTTGCAG	GCAGCGGAAC	CCCCACCTG	GCGACAGGTG	CCTCTGCGGC	6840
CAAAGCCAC	GTGTATAAGA	TACACCTGCA	AAGGCGGCAC	AACCCAGTG	CCACGTTGTG	6900
AGTTGGATAG	TTGTGGAAAG	AGTCAAATGG	CTCTCCTCAA	GCGTATTCAA	CAAGGGGCTG	6960
AAGGATGCCC	AGAAGGTACC	CCATTGTATG	GGATCTGATC	TGGGGCCTCG	GTGCACATGC	7020
TTTACATGTG	TTTAGTCGAG	GTTAAAAAAC	GTCTAGGCCC	CCCGAACCAC	GGGGACGTGG	7080
TTTTCCTTTG	AAAAACACGA	TAATACC				7107

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 22:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12011 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 22:

ATGGGACACTG	AATCTAACAA	TGGCACTGTA	TCTGACATAC	TCTATCCTGA	GTGTCACCTT	60
AACTCTCCTA	TCGTTAAAGG	TAAAATAGCA	CAATTACACA	CTATTATGAG	TCTACCTCAG	120
CCTTATGATA	TGGATGACGA	CTCAATACTA	GTTATCACTA	GACAGAAAAT	AAAACCTTAAT	180
AAATTGGATA	AAAGACAACG	ATCTATTAGA	AGATTAAAAT	TAATATTAAC	TGAAAAAGTG	240
AATGACTTAG	GAAAATACAC	ATTTATCAGA	TATCCAGAAA	TGTCAAAAGA	AATGTTCAAA	300
TTATATATAC	CTGGTATTAA	CAGTAAAGTG	ACTGAATTAT	TACTTAAAGC	AGATAGAACA	360

TATAGTCAAA	TGACTGATGG	ATTAAGAGAT	CTATGGATTA	ATGTGCTATC	AAAATTAGCC	420
TCAAAAAATG	ATGGAAGCAA	TTATGATCTT	AATGAAGAAA	TTAATAATAT	ATCGAAAGTT	480
CACACAACCT	ATAAATCAGA	TAAATGGTAT	AATCCATTCA	AAACATGGTT	TACTATCAAG	540
TATGATATGA	GAAGATTACA	AAAAGCTCGA	AATGAGATCA	CTTTTAATGT	TGGGAAGGAT	600
TATAACTTGT	TAGAAGACCA	GAAGAATTTT	TTATTGATAC	ATCCAGAATT	GGTTTTGATA	660
TTAGATAAAC	AAAACATATA	TGGTTATCTA	ATTACTCCTG	AATTAGTATT	GATGTATTGT	720
GACGTAGTCG	AAGGCCGATG	GAATATAAGT	GCATGTGCTA	AGTTAGATCC	AAAATTACAA	780
TCTATGTATC	AGAAAGGTAA	TAACCTGTGG	GAAGTGATAG	ATAAATTGTT	TCCAATTATG	840
GGAGAAAAGA	CATTTGATGT	GATATCGTTA	TTAGAACCAC	TTGCATTATC	CTTAATTCAA	900
ACTCATGATC	CTGTTAAACA	ACTAAGAGGA	GCTTTTTTTAA	ATCATGTGTT	ATCCGAGATG	960
GAATTAATAT	TTGAATCTAG	AGAATCGATT	AAGGAATTTT	TGAGTGTAGA	TTACATTGAT	1020
AAAATTTTAG	ATATATTTAA	TAAGTCTACA	ATAGATGAAA	TAGCAGAGAT	TTTCTCTTTT	1080
TTTAGAACAT	TTGGGCATCC	TCCATTAGAA	GCTAGTATTG	CAGCAGAAAA	GGTTAGAAAA	1140
TATATGTATA	TTGGAAAACA	ATTAAAATTT	GACACTATTA	ATAAATGTCA	TGCTATCTTC	1200
TGTACAATAA	TAATTAACGG	ATATAGAGAG	AGGCATGGTG	GACAGTGGCC	TCCTGTGACA	1260
TTACCTGATC	ATGCACACGA	ATTCATCATA	AATGCTTACG	GTTCAAACTC	TGCGATATCA	1320
TATGAAAATG	CTGTTGATTA	TTACCAGAGC	TTTATAGGAA	TAAAATTCAA	TAAATTCATA	1380
GAGCCTCAGT	TAGATGAGGA	TTTGACAATT	TATATGAAAG	ATAAAGCATT	ATCTCCAAAA	1440
AAATCAAATT	GGGACACAGT	TTATCCTGCA	TCTAATTTAC	TGTACCGTAC	TAACGCATCC	1500
AACGAATCAC	GAAGATTAGT	TGAAGTATTT	ATAGCAGATA	GTAAATTTGA	TCCTCATCAG	1560
ATATTGGATT	ATGTAGAATC	TGGGGACTGG	TTAGATGATC	CAGAATTTAA	TATTTCTTAT	1620
AGTCTTAAAG	AAAAAGAGAT	CAAACAGGAA	GGTAGACTCT	TTGCAAAAAT	GACATACAAA	1680
ATGAGAGCTA	CACAAGTTTT	ATCAGAGACA	CTACTTGCAA	ATAACATAGG	AAAATTCCTT	1740
CAAGAAAATG	GGATGGTGAA	GGGAGAGATT	GAATTACTTA	AGAGATTAAC	AACCATATCA	1800
ATATCAGGAG	TTCCACGGTA	TAATGAAGTG	TACAATAATT	CTAAAAGCCA	TACAGATGAC	1860
CTTAAAACCT	ACAATAAAAT	AAGTAATCTT	AATTTGTCTT	CTAATCAGAA	ATCAAAGAAA	1920
TTTGAATTCA	AGTCAACGGA	TATCTACAAT	GATGGATACG	AGACTGTGAG	CTGTTTCCTA	1980
ACAACAGATC	TCAAAAAATA	CTGTCTTAAT	TGGAGATATG	AATCAACAGC	TCTATTTGGA	2040
GAAACTTGCA	ACCAAATATT	TGGATTAAAT	AAATTGTTTA	ATTGGTTACA	CCCTCGTCTT	2100
GAAGGAAGTA	CAATCTATGT	AGGTGATCCT	TACTGTCCTC	CATCAGATAA	AGAACATATA	2160
TCATTAGAGG	ATCACCCCTGA	TTCTGGTTTT	TACGTTTATA	ACCCAAGAGG	GGGTATAGAA	2220
GGATTTTGTC	AAAAATTATG	GACACTCATA	TCTATAAGTG	CAATACATCT	AGCAGCTGTT	2280
AGAATAGGCG	TGAGGGTGAC	TGCAATGGTT	CAAGGAGACA	ATCAAGCTAT	AGCTGTAACC	2340
ACAAGAGTAC	CCAACAATTA	TGACTACAGA	GTTAAGAAGG	AGATAGTTTA	TAAAGATGTA	2400
GTGAGATTTT	TTGATTCATT	AAGAGAAGTG	ATGGATGATC	TAGGTCATGA	ACTTAAATTA	2460

AATGAAACGA	TTATAAGTAG	CAAGATGTTT	ATATATAGCA	AAAGAATCTA	TTATGATGGG	2520
AGAATTCTTC	CTCAAGCTCT	AAAAGCATT	TCTAGATGTG	TCTTCTGGTC	AGAGACAGTA	2580
ATAGACGAAA	CAAGATCAGC	ATCTTCAAAT	TTGGCAACAT	CATTTGCAAA	AGCAATTGAG	2640
AATGGTTATT	CACCTGTTCT	AGGATATGCA	TGCTCAATTT	TTAAGAACAT	TCAACAACATA	2700
TATATTGCCC	TTGGGATGAA	TATCAATCCA	ACTATAACAC	AGAATATCAG	AGATCAGTAT	2760
TTTAGGAATC	CAAAATTGGAT	GCAATATGCC	TCTTTAATAC	CTGCTAGTGT	TGGGGGATTC	2820
AATTACATGG	CCATGTCAAG	ATGTTTTGTA	AGGAATATTG	GTGATCCATC	AGTTGCCGCA	2880
TTGGCTGATA	TTAAAAGATT	TATTAAGGCG	AATCTATTAG	ACCGAAGTGT	TCTTTATAGG	2940
ATTATGAATC	AAGAACCAGG	TGAGTCATCT	TTTTTGGAAT	GGGCTTCAGA	TCCATATTCA	3000
TGCAATTTAC	CACAATCTCA	AAATATAACC	ACCATGATAA	AAAATATAAC	AGCAAGGAAT	3060
GTATTACAAG	ATTACACAAA	TCCATTATTA	TCTGGATTAT	TCACAAATAC	AATGATAGAA	3120
GAAGATGAAG	AATTAGCTGA	GTTCTTGATG	GACAGGAAGG	TAATTCTCCC	TAGAGTTGCA	3180
CATGATATTC	TAGATAATTC	TCTCACAGGA	ATTAGAAATG	CCATAGCTGG	AATGTTAGAT	3240
ACGACAAAAT	CACTAATTCG	GGTTGGCATA	AATAGAGGAG	GACTGACATA	TAGTTTGTGT	3300
AGGAAAATCA	GTAATTACGA	TCTAGTACAA	TATGAAACAC	TAAGTAGGAC	TTTGCGACTA	3360
ATTGTAAGTG	ATAAAATCAA	GTATGAAGAT	ATGTGTTTCG	TAGACCTTGC	CATAGCATTG	3420
CGACAAAAGA	TGTGGATTCA	TTTATCAGGA	GGAAGGATGA	TAAGTGGACT	TGAAACGCCT	3480
GACCCATTAG	AATTACTATC	TGGGGTAGTA	ATAACAGGAT	CAGAACATTG	TAAAATATGT	3540
TATTCTTCAG	ATGGCACAAA	CCCATATACT	TGGATGTATT	TACCCGGTAA	TATCAAAATA	3600
GGATCAGCAG	AAACAGGTAT	ATCGTCATTA	AGAGTTCCTT	ATTTTGGATC	AGTCACTGAT	3660
GAAAGATCTG	AAGCACAATT	AGGATATATC	AAGAATCTTA	GTAAACCTGC	AAAAGCCGCA	3720
ATAAGAATAG	CAATGATATA	TACATGGGCA	TTTGGTAATG	ATGAGATATC	TTGGATGGAA	3780
GCCTCACAGA	TAGCACAAAC	ACGTGCAAAT	TTTACACTAG	ATAGTCTCAA	AATTTTAACA	3840
CCGGTAGCTA	CATCAACAAA	TTTATCACAC	AGATTAAAGG	ATACTGCAAC	TCAGATGAAA	3900
TTCTCCAGTA	CATCATTGAT	CAGAGTCAGC	AGATTCATAA	CAATGTCCAA	TGATAACATG	3960
TCTATCAAAG	AAGCTAATGA	AACCAAAGAT	ACTAATCTTA	TTTATCAACA	AATAATGTTA	4020
ACAGGATTAA	GTGTTTTCGA	ATATTTATTT	AGATTAAAAG	AAACCACAGG	ACACAACCCT	4080
ATAGTTATGC	ATCTGCACAT	AGAAGATGAG	TGTGTATTAT	AAGAAAGTTT	TAATGATGAA	4140
CATATTAATC	CAGAGTCTAC	ATTAGAATTA	ATTGATATAT	CTGAAAGTAA	TGAATTTATT	4200
TATGATAAAG	ACCCACTCAA	AGATGTGGAC	TTATCAAAAC	TTATGGTTAT	TAAAGACCAT	4260
TCTTACACAA	TTGATATGAA	TTATTGGGAT	GATACTGACA	TCATACATGC	AATTTCAATA	4320
TGTAATGCAA	TTACAATAGC	AGATACTATG	TCACAATTAG	ATCGAGATAA	TTTAAAAGAG	4380
ATAATAGTTA	TTGCAAATGA	TGATGATATT	AATAGCTTAA	TCAGTGAATT	TTTGACTCTT	4440
GACATACTTG	TATTTCTCAA	GACATTTGGT	GGATTATTAG	TAAATCAATT	TGCATACACT	4500
CTTTATAGTC	TAAAAATAGA	AGGTAGGGAT	CTCATTTGGG	ATTATATAAT	GAGAACACTG	4560

AGAGATACTT	CCCATTCAAT	ATTAAAAGTA	TTATCTAATG	CATTATCTCA	TCCTAAAGTA	4620
TTCAAGAGGT	TCTGGGATTG	TGGAGTTTTA	AACCCTATTT	ATGGTCCTAA	TACTGCTAGT	4680
CAAGACCAGA	TAAAACTTGC	CCTATCTATA	TGTGAATATT	CACTAGATCT	ATTTATGAGA	4740
GAATGGTTGA	ATGGTGTATC	ACTTGAAATA	TACATTTGTG	ACAGCGATAT	GGAAGTTGCA	4800
AATGATAGGA	AACAAGCCTT	TATTTCTAGA	CACCTTTCAT	TTGTTTGTG	TTTAGCAGAA	4860
ATTGCATCTT	TCGGACCTAA	CCTGTTA AAC	TTAACATACT	TGGAGAGACT	TGATCTATTG	4920
AAACAATATC	TTGAATTAAA	TATTAAAGAA	GACCCTACTC	TTAAATATGT	ACAAATATCT	4980
GGATTATTAA	TTAAATCGTT	CCCATCAACT	GTAACATACG	TAAGAAAGAC	TGCAATCAAA	5040
TATCTAAGGA	TTGCGGGTAT	TAGTCCACCT	GAGGTAATTG	ATGATTGGGA	TCCGGTAGAA	5100
GATGAAAATA	TGCTGGATAA	CATTGTCAAA	ACTATAAATG	ATAACTGTAA	TAAAGATAAT	5160
AAAGGGAATA	AAATTAACAA	TTTCTGGGGA	CTAGCACTTA	AGAACTATCA	AGTCCTTAAA	5220
ATCAGATCTA	TAACAAGTGA	TTCTGATGAT	AATGATAGAC	TAGATGCTAA	TACAAGTGGT	5280
TTGACACTTC	CTCAAGGAGG	GAATTATCTA	TCGCATCAAT	TGAGATTATT	CGGAATCAAC	5340
AGCACTAGTT	GTCTGAAAGC	TCTTGAGTTA	TCACAAATTT	TAATGAAGGA	AGTCAATAAA	5400
GACAAGGACA	GGCTCTTCCT	GGGAGAAGGA	GCAGGAGCTA	TGCTAGCATG	TTATGATGCC	5460
ACATTAGGAC	CTGCAGTTAA	TTATTATAAT	TCAGGTTTGA	ATATAACAGA	TGTAATTGGT	5520
CAACGAGAAT	TGAAAATATT	TCCTTCAGAG	GTATCATTAG	TAGGTAAAAA	ATTAGGAAAT	5580
GTGACACAGA	TTCTTAACAG	GGTAAAAGTA	CTGTTCAATG	GGAATCCTAA	TTCAACATGG	5640
ATAGGAAATA	TGGAATGTGA	GAGCTTAATA	TGGAGTGAAT	TAAATGATAA	GTCCATTGGA	5700
TTAGTACATT	GTGATATGGA	AGGAGCTATC	GGTAAATCAG	AAGAACTGT	TCTACATGAA	5760
CATTATAGTG	TTATAAGAAT	TACATACTTG	ATTGGGGATG	ATGATGTTGT	TTTAGTTTCC	5820
AAAATTATAC	CTACAATCAC	TCCGAATTGG	TCTAGAATAC	TTTATCTATA	TAAATTATAT	5880
TGGAAAGATG	TAAGTATAAT	ATCACTCAAA	ACTTCTAATC	CTGCATCAAC	AGAATTATAT	5940
CTAATTTCGA	AAGATGCATA	TTGTACTATA	ATGGAACCTA	GTGAAATTGT	TTTATCAAAA	6000
CTTAAAAGAT	TGTCACTCTT	GGAAGAAAAT	AATCTATTAA	AATGGATCAT	TTTATCAAAG	6060
AAGAGGAATA	ATGAATGGTT	ACATCATGAA	ATCAAAGAAG	GAGAAAGAGA	TTATGGAATC	6120
ATGAGACCAT	ATCATATGGC	ACTACAAATC	TTTGATTTC	AAATCAATTT	AAATCATCTG	6180
GCGAAAGAAT	TTTTATCAAC	CCCAGATCTG	ACTAATATCA	ACAATATAAT	CCAAAGTTTT	6240
CAGCGAACAA	TAAAGGATGT	TTTATTTGAA	TGGATTAATA	TAACTCATGA	TGATAAGAGA	6300
CATAAATTAG	GCGGAAGATA	TAACATATTC	CCACTGAAAA	ATAAGGGAAA	GTTAAGACTG	6360
CTATCGAGAA	GACTAGTATT	AAGTTGGATT	TCATTATCAT	TATCGACTCG	ATTACTTACA	6420
GGTCGCTTTC	CTGATGAAAA	ATTTGAACAT	AGAGCACAGA	CTGGATATGT	ATCATTAGCT	6480
GATACTGATT	TAGAATCATT	AAAGTTATTG	TCGAAAAACA	TCATTAAGAA	TTACAGAGAG	6540
TGTATAGGAT	CAATATCATA	TTGGTTTCTA	ACCAAAGAAG	TTAAAATACT	TATGAAATTG	6600
ATTGGTGGTG	CTAAATTATT	AGGAATTCCC	AGACAATATA	AAGAACCGGA	AGACCAGTTA	6660

TTAGAAAAC	ACAATCAACA	TGATGAATTT	GATATCGATT	AAAACATAAA	TACAATGTCG	6720
ACGATCCGGC	TGCTAACAAA	GCCCGAAAGG	AAGCTGAGTT	GGCTGCTGCC	ACCGCTGAGC	6780
AATAACTAGC	ATAACCCCTT	GGGGCCTCTA	AACGGGTCTT	GAGGGGTTTT	TTGCTGAAAG	6840
GAGGAAC	TATATCCGGATCG	AGATCAATTC	TGTGAGCGTA	TGGCAAACGA	AGGAAAAATA	6900
GTTATAGTAG	CCGCACTCGA	TGGGACATTT	CAACGTAAAC	CGTTTAATAA	TATTTTGAAT	6960
CTTATTCCAT	TATCTGAAAT	GGTGGTAAAA	CTAACTGCTG	TGTGTATGAA	ATGCTTTAAG	7020
GAGGCTTCCT	TTTCTAAACG	ATTGGGTGAG	GAAACCGAGA	TAGAAATAAT	AGGAGGTAAT	7080
GATATGTATC	AATCGGTGTG	TAGAAAGTGT	TACATCGACT	CATAATATTA	TATTTTTTAT	7140
CTAAAAA	ACT AAAAATAAAC	ATTGATTAAA	TTTTAATATA	ATACTTAAAA	ATGGATGTTG	7200
TGTCGTTAGA	TAAACCGTTT	ATGTATTTTG	AGGAAATTGA	TAATGAGTTA	GATTACGAAC	7260
CAGAAAGTGC	AAATGAGGTC	GCAAAAAAAC	TGCCGTATCA	AGGACAGTTA	AAACTATTAC	7320
TAGGAGAATT	ATTTTTTCTT	AGTAAGTTAC	AGCGACACGG	TATATTAGAT	GGTGCCACCG	7380
TAGTGTATAT	AGGATCTGCT	CCCGGTACAC	ATATACGTTA	TTTGAGAGAT	CATTTCTATA	7440
ATTTAGGAGT	GATCATCAAA	TGGATGCTAA	TTGACGGCCG	CCATCATGAT	CCTATTTTAA	7500
ATGGATTGCG	TGATGTGACT	CTAGTGACTC	GGTTCGTTGA	TGAGGAATAT	CTACGATCCA	7560
TCAAAAAACA	ACTGCATCCT	TCTAAGATTA	TTTTAATTTT	TGATGTGAGA	TCCAAACGAG	7620
GAGGAAATGA	ACCTAGTACG	GCGGATTTAC	TAAGTAATTA	CGCTCTACAA	AATGTCATGA	7680
TTAGTATTTT	AAACCCCGTG	GCGTCTAGTC	TTAAATGGAG	ATGCCCGTTT	CCAGATCAAT	7740
GGATCAAGGA	CTTTTATATC	CCACACGGTA	ATAAAATGTT	ACAACCTTTT	GCTCCTTCAT	7800
ATTCAGGGCC	GTCGTTTTAC	AACGTCGTGA	CTGGGAAAAC	CCTGGCGTTA	CCCAACTTAA	7860
TCGCCTTGCA	GCACATCCCC	CTTTCGCCAG	CTGGCGTAAT	AGCGAAGAGG	CCCGCACCGA	7920
TCGCCCTTCC	CAACAGTTGC	GCAGCCTGAA	TGGCGAATGG	CGCGACGCGC	CCTGTAGCGG	7980
CGCATTAAAGC	GCGGCGGGTG	TGGTGGTTAC	GCGCAGCGTG	ACCGCTACAC	TTGCCAGCGC	8040
CCTAGCGCCC	GCTCCTTTTCG	CTTTCTTCCC	TTCTTTTCTC	GCCACGTTTCG	CGGGCTTTCC	8100
CCGTCAAGCT	CTAAATCGGG	GGCTCCCTTT	AGGGTTCCGA	TTTAGTGCTT	TACGGCACCT	8160
CGACCCCAAA	AAACTTGATT	AGGGTGATGG	TTACGTTAGT	GGGCCATCGC	CCTGATAGAC	8220
GGTTTTTCGC	CCTTTGACGT	TGGAGTCCAC	GTTCTTTAAT	AGTGGACTCT	TGTTCCAAAC	8280
TGGAACAACA	CTCAACCCTA	TCTCGGTCTA	TTCTTTTGAT	TTATAAGGGA	TTTTGCCGAT	8340
TTCGGCCTAT	TGGTTAAAAA	ATGAGCTGAT	TTAACAAAAA	TTTAACGCGA	ATTTTAACAA	8400
AATATTAACG	TTTACAATTT	CCCAGGTGGC	ACTTTTCGGG	GAAATGTGCG	CGGAACCCCT	8460
ATTTGTTTAT	TTTTCTAAAT	ACATTCAAAT	ATGTATCCGC	TCATGAGACA	ATAACCTGA	8520
TAAATGCTTC	AATAATATTG	AAAAAGGAAG	AGTATGAGTA	TTCAACATTT	CCGTGTCGCC	8580
CTTATTCCTT	TTTTTGCGGC	ATTTTGCTTT	CCTGTTTTTG	CTCACCAGGA	AACGCTGGTG	8640
AAAGTAAAAG	ATGCTGAAGA	TCAGTTGGGT	GCACGAGTGG	GTTACATCGA	ACTGGATCTC	8700
AACAGCGGTA	AGATCCTTGA	GAGTTTTTCGC	CCCGAAGAAC	GTTTTCCAAT	GATGAGCACT	8760

TTTAAAGTTC	TGCTATGTGG	CGCGGTATTA	TCCCGTATTG	ACGCCGGGCA	AGAGCAACTC	8820
GGTCGCCGCA	TACACTATTG	TCAGAATGAC	TTGGTTGAGT	ACTCACCAGT	CACAGAAAAG	8880
CATCTTACGG	ATGGCATGAC	AGTAAGAGAA	TTATGCAGTG	CTGCCATAAC	CATGAGTGAT	8940
AACACTGCGG	CCAACCTACT	TCTGACAACG	ATCGGAGGAC	CGAAGGAGCT	AACCGCTTTT	9000
TTGCACAACA	TGGGGGATCA	TGTAACTCGC	CTTGATCGTT	GGGAACCGGA	GCTGAATGAA	9060
GCCATACCAA	ACGACGAGCG	TGACACCACG	ATGCCGTGAG	CAATGGCAAC	AACGTTGCGC	9120
AAACTATTAA	CTGGCGAACT	ACTTACTCTA	GCTTCCCGGC	AACAATTAAT	AGACTGGATG	9180
GAGGCGGATA	AAGTTGCAGG	ACCACTTCTG	CGCTCGGCCC	TTCCGGCTGG	CTGGTTTATT	9240
GCTGATAAAT	CTGGAGCCGG	TGAGCGTGGG	TCTCGCGGTA	TCATTGCAGC	ACTGGGGCCA	9300
GATGGTAAGC	CCTCCCGTAT	CGTAGTTATC	TACACGACGG	GGAGTCAGGC	AACATATGGAT	9360
GAACGAAATA	GACAGATCGC	TGAGATAGGT	GCCTCACTGA	TTAAGCATTG	GTAACGTGCA	9420
GACCAAGTTT	ACTCATATAT	ACTTTAGATT	GATTTAAAAC	TTCAATTTTA	ATTTAAAAGG	9480
ATCTAGGTGA	AGATCCTTTT	TGATAATCTC	ATGACCAAAA	TCCCTTAACG	TGAGTTTTCG	9540
TTCCACTGAG	CGTCAGACCC	CGTAGAAAAG	ATCAAAGGAT	CTTCTTGAGA	TCCTTTTTTT	9600
CTGCGCGTAA	TCTGCTGCTT	GCAAACAAAA	AAACCACCGC	TACCAGCGGT	GGTTTGTGTT	9660
CCGGATCAAG	AGCTACCAAC	TCTTTTTCCG	AAGGTAAGTG	GCTTCAGCAG	AGCGCAGATA	9720
CCAAATACTG	TCCTTCTAGT	GTAGCCGTAG	TTAGGCCACC	ACTTCAAGAA	CTCTGTAGCA	9780
CCGCCTACAT	ACCTCGCTCT	GCTAATCCTG	TTACCAGTGG	CTGCTGCCAG	TGGCGATAAG	9840
TCGTGTCTTA	CCGGGTGGA	CTCAAGACGA	TAGTTACCGG	ATAAGGCGCA	GCGGTCGGGC	9900
TGAACGGGGG	GTTCTGTGAC	ACAGCCCAGC	TTGGAGCGAA	CGACCTACAC	CGAACTGAGA	9960
TACCTACAGC	GTGAGCTATG	AGAAAGCGCC	ACGCTTCCCG	AAGGGAGAAA	GGCGGACAGG	10020
TATCCGGTAA	GCGGCAGGGT	CGGAACAGGA	GAGCGCACGA	GGGAGCTTCC	AGGGGGAAAC	10080
GCCTGGTATC	TTTATAGTCC	TGTCGGGTTT	CGCCACCTCT	GACTTGAGCG	TCGATTTTTG	10140
TGATGCTCGT	CAGGGGGGCG	GAGCCTATGG	AAAAACGCCA	GCAACGCGGC	CTTTTTACGG	10200
TTCTTGGCCT	TTTGCTGGCC	TTTTGCTCAC	ATGTTCTTTC	CTGCGTTATC	CCCTGATTCT	10260
GTGGATAACC	GTATTACCGC	CTTTGAGTGA	GCTGATACCG	CTGCGCCGAG	CCGAACGACC	10320
GAGCGCAGCG	AGTCAGTGAG	CGAGGAAGCG	GAAGAGCGCC	CAATACGCAA	ACCGCTCTC	10380
CCCGCGCGTT	GGCCGATTCA	TTAATGCAGC	TGGCACGACA	GGTTTCCCGA	CTGGAAAGCG	10440
GGCAGTGAGC	GCAACGCAAT	TAATGTGAGT	TAGCTCACTC	ATTAGGCACC	CCAGGCTTTA	10500
CACTTTATGC	TTCCGGCTCG	TATGTTGTGT	GGAATTGTGA	GCGGATAACA	ATTTACACAC	10560
GGAAACAGCT	ATGACCATGA	TTACGCCAAG	CTTTTGCGAT	CAATAAATGG	ATCACAACCA	10620
GTATCTCTTA	ACGATGTTCT	TGCGAGATGA	TGATTCAATT	TTTAAGTATT	TGGCTAGTCA	10680
AGATGATGAA	TCTTCATTAT	CTGATATATT	GCAAACTCACT	CAATATCTAG	ACTTTCTGTT	10740
ATTATTATTG	ATCCAATCAA	AAAATAAATT	AGAAGCCGTG	GGTCATTGTT	ATGAATCTCT	10800
TTGAGAGGAA	TACAGACAAT	TGACAAAATT	CACAGACTTT	CAAGATTTTA	AAAACTGTT	10860

TAACAAGGTC	CCTATTGTTA	CAGATGGAAG	GGTCAAACCTT	AATAAAGGAT	ATTTGTTTCGA	10920
CTTTGTGATT	AGTTTGATGC	GATTCAAAAA	AGAATCCTCT	CTAGCTACCA	CCGCAATAGA	10980
TCCTGTTAGA	TACATAGATC	CTCGTCGCAA	TATCGCATT	TCTAACGTGA	TGGATATATT	11040
AAAGTCGAAT	AAAGTGAACA	ATAATTAATT	CTTTATTGTC	ATCATGAACG	GCGGACATAT	11100
TCAGTTGATA	ATCGGCCCCA	TGTTTTTCAGG	TAAAAGTACA	GAATTAATTA	GACGAGTTAG	11160
ACGTTATCAA	ATAGCTCAAT	ATAAATGCGT	GACTATAAAA	TATTCTAACG	ATAATAGATA	11220
CGGAACGGGA	CTATGGACGC	ATGATAAGAA	TAATTTTGAA	GCATTGGAAG	CAACTAACT	11280
ATGTGATGTC	TTGGAATCAA	TTACAGATTT	CTCCGTGATA	GGTATCGATG	AAGGACAGTT	11340
CTTTCCAGAC	ATTGTTGAAT	TGATCTCGAT	CCCGCGAAAT	TAATACGACT	CACTATAGGG	11400
AGACCACAAC	GGTTTCCCTC	TAGCGGGATC	AATTCGCCCC	CTCTCCCTCC	CCCCCCCCTA	11460
ACGTTACTGG	CCGAAGCCGC	TTGGAATAAG	GCCGGTGTGC	GTTTGTCTAT	ATGTTATTTT	11520
CCACCATATT	GCCGTCTTTT	GGCAATGTGA	GGGCCCGGAA	ACCTGGCCCT	GTCTTCTTGA	11580
CGAGCATTCC	TAGGGGTCTT	TCCCCTCTCG	CCAAAGGAAT	GCAAGGTCTG	TTGAATGTCTG	11640
TGAAGGAAGC	AGTTCCTCTG	GAAGCTTCTT	GAAGACAAAC	AACGTCTGTA	GCGACCTTTT	11700
GCAGGCAGCG	GAACCCCCCA	CCTGGCGACA	GGTGCCTCTG	CGGCCAAAAG	CCACGTGTAT	11760
AAGATACACC	TGCAAAGGCG	GCACAACCCC	AGTGCCACGT	TGTGAGTTGG	ATAGTTGTGG	11820
AAAGAGTCAA	ATGGCTCTCC	TCAAGCGTAT	TCAACAAGGG	GCTGAAGGAT	GCCCAGAAGG	11880
TACCCCATTG	TATGGGATCT	GATCTGGGGC	CTCGGTGCAC	ATGCTTTACA	TGTGTTTAGT	11940
CGAGGTTAAA	AAACGTCTAG	GCCCCCGGAA	CCACGGGGAC	GTGGTTTTCC	TTTGAAAAAC	12000
ACGATAATAC	C					12011

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 23:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 23:

15 GATCGATGCT AGCCC 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 24:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 24:

GATCGGGCTA GCATC 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 25:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 25:

15 TTACATGGCC AT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 26:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 26:

30 TCACATGGCG AT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 27:

TTTGACTGG GC 12

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 28:

55 TTTTGATTGG GC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 29:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 29:
TGGTCCTAAT ACTG 14

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 14 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 30:
TGGGCCTAAT ATCG 14

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 31:
GCATTATCTA GATGTGTCTT CTGGTCAGAG 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 32:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 32:
CCTGAATTAT AATAATTAAC TGCAGGTCCT 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 33:

GGGAAAGAAT CCAGAGACAA GAACGG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 34:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 34:
15 GGTGAAGTTG TGGATCCATT TGATTG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 35:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 35:
30 CAACCTGTAA GGTACCAGCA TCCG 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 36:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 27 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 36:
GATATGGTGT TAGGCCTTGA TCTGTTC 27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 37:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 29 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 37:
CGCCATGGAA AAATCAGAGA TCCTCTTCT 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 38:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
97

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 38:
CTGGATCCTA ATTGGAGTTG TTACCCATGT A 31

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 39:
AACCATGGCT GAAAAAGGGA AAA 23

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 40:
GGTGAAGCTT AAGATGTGAT TTTACATATT TTA 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 41:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 41:
AAATAGGATC CCTACAGATC ATTAGATATT AAAAT 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 42:

CGCCATGGTG TTCAGTGCTT GTTG 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 43:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 43:

15 CCACAAGCTT AATTAACCAT AATATGCATC A 31

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 44:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 29 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 44:

30 TTCCATGGAT TTGGATTTGT CTATTGGGT 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 15462 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 45:

ACCAAACAAG AGAAGAACT TGCTTGGTAA TATAAATTTA ACTTAAAATT AACTTAGGAT 60
TTAAGACATT GACTAGAAGG TCAAGAAAAG GGAACCTCTAT AATTTCAAAA ATGTTGAGCC 120
TATTTGATAC ATTTAATGCA CGTAGGCAAG AAAACATAAC AAAATCAGCC GGTGGAGCTA 180
TCATTCTCTGG ACAGAAAAAT ACTGTCTCTA TATTCGCCCT TGGACCGACA ATAAGTGATG 240
ATAATGAGAA AATGACATTA GCTCTTCTAT TTCTATCTCA TTCACTAGAT AATGAGAAAC 300

45

AACATGCACA	AAGGGCAGGG	TTCTTGGTGT	CTTTATTGTC	AATGGCTTAT	GCCAATCCAG	360
AGCTCTACCT	AACAACAAAT	GGAAGTAATG	CAGATGCCAA	GTATGTCATA	TACATGATTG	420
AGAAAGATCT	AAAACGGCAA	AAGTATGGAG	GATTTGTGGT	TAAGACGAGA	GAGATGATAT	480
ATGAAAAGAC	AACTGATTGG	ATATTTGGAA	GTGACCTGGA	TTATGATCAG	GAACTATGT	540
TGCAGAACGG	CAGGAACAAT	TCAACAATTG	AAGACCTTGT	CCACACATTT	GGGTATCCAT	600
CATGTTTAGG	AGCTCTTATA	ATACAGATCT	GGATAGTTCT	GGTCAAAGCT	ATCACTAGTA	660
TCTCAGGGTT	AAGAAAAGGC	TTTTTCACCC	GATTGGAAGC	TTTCAGACAA	GATGGAACAG	720
TGCAGGCAGG	GCTGGTATTG	AGCGGTGACA	CAGTGGATCA	GATTGGGTCA	ATCATGCGGT	780
CTCAACAGAG	CTTGGTAACT	CTTATGGTTG	AAACATTAAT	AACAATGAAT	ACCAGCAGAA	840
ATGACCTCAC	AACCATAGAA	AAGAATATAC	AAATTGTTGG	CAACTACATA	AGAGATGCAG	900
GTCTCGCTTC	ATTCTTCAAT	ACAATCAGAT	ATGGAATTGA	GACCAGAATG	GCAGCTTTGA	960
CTCTATCCAC	TCTCAGACCA	GATATCAATA	GATTAAGAGC	TTTGATGGAA	CTGTATTTAT	1020
CAAAGGGACC	ACGCGCTCCT	TTCATCTGTA	TCCTCAGAGA	TCCTATACAT	GGTGAGTTCTG	1080
CACCAGGCAA	CTATCCTGCC	ATATGGAGCT	ATGCAATGGG	GGTGGCAGTT	GTACAAAATA	1140
GAGCCATGCA	ACAGTATGTG	ACGGGAAGAT	CATATCTAGA	CATTGATATG	TTCCAGCTAG	1200
GACAAGCAGT	AGCACGTGAT	GCCGAAGCTC	AAATGAGCTC	AACACTGGAA	GATGAACTTG	1260
GAGTGACACA	CGAAGCTAAA	GAAAGCTTGA	AGAGACATAT	AAGGAACATA	AACAGTTCAG	1320
AGACATCTTT	CCACAAACCG	ACAGGTGGAT	CAGCCATAGA	GATGGCAATA	GATGAAGAGC	1380
CAGAACAATT	CGAACATAGA	GCAGATCAAG	AACAAAATGG	AGAACCCTCA	TCATCCATAA	1440
TTCAATATGC	CTGGGCAGAA	GGAAATAGAA	GCGATGATCA	GACTGAGCAA	GCTACAGAAT	1500
CTGACAATAT	CAAGACCGAA	CAACAAAACA	TCAGAGACAG	ACTAAACAAG	AGACTCAACG	1560
ACAAGAAGAA	ACAAAGCAGT	CAACCACCCA	CTAATCCCAC	AAACAGAACA	AACCAGGACG	1620
AAATAGATGA	TCTGTTTAAC	GCATTTGGAA	GCAACTAATC	GAATCAACAT	TTTAATCTAA	1680
ATCAATAATA	AATAAGAAAA	ACTTAGGATT	AAAGAATCCT	ATCATACGGG	AATATAGGGT	1740
GGTAAATTTA	GAGTCTGCTT	GAAACTCAAT	CAATAGAGAG	TTGATGGAAA	GCGATGCTAA	1800
AAACTATCAA	ATCATGGATT	CTTGGGAAGA	GGAATCAAGA	GATAAATCAA	CTAATATCTC	1860
CTCGGCCCTC	AACATCATTG	AATTCATACT	CAGCACCAGC	CCCCAAGAAG	ACTTATCGGA	1920
AAACGACACA	ATCAACACAA	GAACCCAGCA	ACTCAGTGCC	ACCATCTGTC	AACCAGAAAT	1980
CAAACCAACA	GAAACAAGTG	AGAAAGATAG	TGGATCAACT	GACAAAAATA	GACAGTCTGG	2040
GTCATCACAC	GAATGTACAA	CAGAAGCAAA	AGATAGAAAC	ATTGATCAGG	AAACTGTACA	2100
GAGAGGACCT	GGGAGAAGAA	GCAGCTCAGA	TAGTAGAGCT	GAGACTGTGG	TCTCTGGAGG	2160
AATCCCCAGA	AGCATCACAG	ATTCTAAAAA	TGGAACCCAA	AACACGGAGG	ATATTGATCT	2220
CAATGAAATT	AGAAAGATGG	ATAAGGACTC	TATTGAGGGG	AAAATGCGAC	AATCTGCAAA	2280
TGTTCCAAGC	GAGATATCAG	GAAGTGATGA	CATATTTACA	ACAGAACAAA	GTAGAAACAG	2340
TGATCATGGA	AGAAGCCTGG	AATCTATCAG	TACACCTGAT	ACAAGATCAA	TAAGTGTGT	2400

TACTGCTGCA	ACACCAGATG	ATGAAGAAGA	AATACTAATG	AAAAATAGTA	GGACAAAGAA	2460
AAGTTCTTCA	ACACATCAAG	AAGATGACAA	AAGAATTAAA	AAAGGGGGAA	AAGGGAAAGA	2520
CTGGTTTAAG	AAATCAAAAG	ATACCGACAA	CCAGATACCA	ACATCAGACT	ACAGATCCAC	2580
ATCAAAAGGG	CAGAAGAAAA	TCTCAAAGAC	AACAACCACC	AACACCGACA	CAAAGGGGCA	2640
AACAGAAATA	CAGACAGAAT	CATCAGAAAC	ACAATCCTCA	TCATGGAATC	TCATCATCGA	2700
CAACAACACC	GACCGGAACG	AACAGACAAG	CACAACCTCT	CCAACAACAA	CTTCCAGATC	2760
AACTTATACA	AAAGAATCGA	TCCGAACAAA	CTCTGAATCC	AAACCCAAGA	CACAAAAGAC	2820
AAATGGAAAG	GAAAGGAAGG	ATACAGAAGA	GAGCAATCGA	TTTACAGAGA	GGGCAATTAC	2880
TCTATTGCAG	AATCTTGGTG	TAATTCAATC	CACATCAAAA	CTAGATTTAT	ATCAAGACAA	2940
ACGAGTTGTA	TGTGTAGCAA	ATGTACTAAA	CAATGTAGAT	ACTGCATCAA	AGATAGATTT	3000
CCTGGCAGGA	TTAGTCATAG	GGGTTTCAAT	GGACAACGAC	ACAAAATTAA	CACAGATACA	3060
AAATGAAATG	CTAAACCTCA	AAGCAGATCT	AAAGAAAATG	GACGAATCAC	ATAGAAGATT	3120
GATAGAAAAT	CAAAGAGAAC	AACTGTCATT	GATCACGTCA	CTAATTTCAA	ATCTCAAAAT	3180
TATGACTGAG	AGAGGAGGAA	AGAAAGACCA	AAATGAATCC	AATGAGAGAG	TATCCATGAT	3240
CAAAACAAAA	TTGAAAGAAG	AAAAGATCAA	GAAGACCAGG	TTTGACCCAC	TTATGGAGGC	3300
ACAAGGCATT	GACAAGAATA	TACCCGATCT	ATATCGACAT	GCAGGAGATA	CACTAGAGAA	3360
CGATGTACAA	GTTAAATCAG	AGATATTAAG	TTCATACAAT	GAGTCAAATG	CAACAAGACT	3420
AATACCCAAA	AAAGTGAGCA	GTACAATGAG	ATCACTAGTT	GCAGTCATCA	ACAACAGCAA	3480
TCTCTCACAA	AGCACAAAAC	AATCATACAT	AAACGAACTC	AAACGTTGCA	AAAATGATGA	3540
AGAAGTATCT	GAATTAATGG	ACATGTTCAA	TGAAGATGTC	AACAATTGCC	AATGATCCAA	3600
CAAAGAAACG	ACACCGAACA	AACAGACAAG	AAACAACAGT	AGATCAAAAC	CTGTCAACAC	3660
ACACAAAATC	AAGCAGAATG	AAACAACAGA	TATCAATCAA	TATACAAATA	AGAAAACTT	3720
AGGATTAAAG	AATAAATTAA	TCCTTGTTCA	AAATGAGTAT	AACTAACTCT	GCAATATACA	3780
CATTCCCAGA	ATCATCATT	TCTGAAAATG	GTCTATATAGA	ACCATTACCA	CTCAAAGTCA	3840
ATGAACAGAG	GAAAGCAGTA	CCCCACATTA	GAGTTGCCAA	GATCGGAAAT	CCACCAAAAC	3900
ACGGATCCCG	GTATTTAGAT	GTCTTCTTAC	TCGGCTTCTT	CGAGATGGAA	CGAATCAAAG	3960
ACAAATACGG	GAGTGTGAAT	GATCTCGACA	GTGACCCGAG	TTACAAAGTT	TGTGGCTCTG	4020
GATCATTACC	AATCGGATTG	GCTAAGTACA	CTGGGAATGA	CCAGGAATTG	TTACAAGCCG	4080
CAACCAAACT	GGATATAGAA	GTGAGAAGAA	CAGTCAAAGC	GAAAGAGATG	GTTGTTTACA	4140
CGGTACAAAA	TATAAAACCA	GAACTGTACC	CATGGTCCAA	TAGACTAAGA	AAAGGAATGC	4200
TGTTTCGATGC	CAACAAAGTT	GCTCTTGCTC	CTCAATGTCT	TCCACTAGAT	AGGAGCATAA	4260
AATTTAGAGT	AATCTTCGTG	AATTGTACGG	CAATTGGATC	AATAACCTTG	TTCAAAATTC	4320
CTAAGTCAAT	GGCATCACTA	TGGTTAACCA	ACACAATATC	AATCAATCTG	CAGGTACACA	4380
TAAAAACAGG	GGTTCAGACT	GATTCTAAAG	GGATAGTTCA	AATTTTGGAT	GAGAAAGGCG	4440
AAAAATCACT	GAATTTCAATG	GTCCATCTCG	GATTGATCAA	AAGAAAAGTA	GGCAGAATGT	4500

ACTCTGTTGA	ATACTGTAAA	CAGAAAATCG	AGAAAATGAG	ATTGATATTT	TCTTTAGGAC	4560
TAGTTGGAGG	AATCAGTCTT	CATGTCAATG	CAACTGGGTC	CATATCAAAA	ACACTAGCAA	4620
GTCAGCTGGT	ATTCAAAAGA	GAGATTTGTT	ATCCTTTAAT	GGATCTAAAT	CCGCATCTCA	4680
ATCTAGTTAT	CTGGGCTTCA	TCAGTAGAGA	TTACAAGAGT	GGATGCAATT	TTCCAACCTT	4740
CTTTACCTGG	CGAGTTCAGA	TACTATCCTA	ATATTATTGC	AAAAGGAGTT	GGGAAAATCA	4800
AACAATGGAA	CTAGTAATCT	CTATTTTAGT	CCGGACGTAT	CTATTAAGCC	GAAGCAAATA	4860
AAGGATAATC	AAAAACTTAG	GACAAAAGAG	GTCAATACCA	ACAACTATTA	GCAGTCACAC	4920
TCGCAAGAAT	AAGAGAGAAG	GGACCAAAAA	AGTCAAATAG	GAGAAATCAA	AACAAAAGGT	4980
ACAGAACACC	AGAACAACAA	AATCAAAACA	TCCAACCTCAC	TCAAAACAAA	AATTCCAAAA	5040
GAGACCGGCA	ACACAACAAG	CACTGAACAC	AATGCCAACT	TCAATACTGC	TAATTATTAC	5100
AACCATGATC	ATGGCATCTT	TCTGCCAAAT	AGATATCACA	AAACTACAGC	ACGTAGGTGT	5160
ATTGGTCAAC	AGTCCCAAAG	GGATGAAGAT	ATCACAAAAC	TTTGAAACAA	GATATCTAAT	5220
TTTGAGCCTC	ATACCAAAAA	TAGAAGACTC	TAACTCTTGT	GGTGACCAAC	AGATCAAGCA	5280
ATACAAGAAG	TTATTGGATA	GACTGATCAT	CCCTTTATAT	GATGGATTAA	GATTACAGAA	5340
AGATGTGATA	GTAACCAATC	AAGAATCCAA	TGAAAACACT	GATCCCAGAA	CAAAACGATT	5400
CTTTGGAGGG	GTAATTGGAA	CCATTGCTCT	GGGAGTAGCA	ACCTCAGCAC	AAATTACAGC	5460
GGCAGTTGCT	CTGGTTGAAG	CCAAGCAGGC	AAGATCAGAC	ATCGAAAAAC	TCAAAGAAGC	5520
AATTAGGGAC	ACAAACAAAG	CAGTGCAGTC	AGTTCAGAGC	TCCATAGGAA	ATTTAATAGT	5580
AGCAATTAAA	TCAGTCCAGG	ATTATGTTAA	CAAAGAAATC	GTGCCATCGA	TTGCGAGGCT	5640
AGGTTGTGAA	GCAGCAGGAC	TTCAATTAGG	AATTGCATTA	ACACAGCATT	ACTCAGAATT	5700
AACAAACATA	TTTGGTGATA	ACATAGGATC	GTTACAAGAA	AAAGGAATAA	AATTACAAGG	5760
TATAGCATCA	TTATACCGCA	CAATATCAC	AGAAATATTC	ACAACATCAA	CAGTTGATAA	5820
ATATGATATC	TATGATCTGT	TATTTACAGA	ATCAATAAAG	GTGAGAGTTA	TAGATGTTGA	5880
CTTGAATGAT	TACTCAATCA	CCCTCCAAGT	CAGACTCCCT	TTATTAACTA	GGCTGCTGAA	5940
CACTCAGATC	TACAAAGTAG	ATTCCATATC	ATATAACATC	CAAAACAGAG	AATGGTATAT	6000
CCCTCTTCCC	AGCCATATCA	TGACGAAAGG	GGCATTCTTA	GGTGGAGCAG	ACGTCAAAGA	6060
ATGTATAGAA	GCATTCAGCA	GCTATATATG	CCCTTCTGAT	CCAGGATTGT	TATTAAACCA	6120
TGAAATAGAG	AGCTGCTTAT	CAGGAAACAT	ATCCCAATGT	CCAAGAACAA	CGGTCACATC	6180
AGACATTGTT	CCAAGATATG	CATTGTGCAA	TGGAGGAGTG	GTTGCAAAC	GTATAACAAC	6240
CACCTGTACA	TGCAACGGAA	TTGGTAATAG	AATCAATCAA	CCACCTGATC	AAGGAGTAAA	6300
AATTATAACA	CATAAAGAAT	GTAGTACTGT	GGGTATCAAC	GGAATGCTGT	TCAATACAAA	6360
TAAAGAAGGA	ACTCTTGCA	TCTATACACC	AAATGATATA	ACACTAAACA	ATTCTGTTAC	6420
ACTGGATCCA	ATTGACATAT	CAATCGAGCT	CAACAAGGCC	AAATCAGATC	TAGAAGAATC	6480
AAAAGAATGG	ATAAGAAGGT	CAAATCAAAA	ACTAGATTCT	ATTGGAAATT	GGCATCAATC	6540
TAGCACTACA	ATCATAATTA	TTTTGATAAT	GATCATTATA	TGTTTTATAA	TTAATATAAC	6600

GATAATTACA	ATTGCAATTA	AGTATTACAG	AATTCAAAAG	AGAAATCGAG	TGGATCAAAA	6660
TGACAAGCCA	TATGTACTAA	CAAACAAATA	ACATATCTAC	AGATCATTAG	ATATTAAAAT	6720
TATAAAAAAC	TTAGGAGTAA	AGTTACGCAA	TCCAACCTCTA	CTCATATAAT	TGAGGAAGGA	6780
CCCAATAGAC	AAATCCAAAT	TCGAGATGGA	ATACTGGAAG	CATACCAATC	ACGGAAGGA	6840
TGCTGGTAAT	GAGCTGGAGA	CGTCTATGGC	TACTCATGGC	AACAAGCTCA	CTAATAAGAT	6900
AATATACATA	TTATGGACAA	TAATCCTGGT	GTTATTATCA	ATAGTCTTCA	TCATAGTGCT	6960
AATTAATTCC	ATCAAAAGTG	AAAAGGCCCA	CGAATCATTG	CTGCAAGACA	TAAATAATGA	7020
GTTTATGGAA	ATTACAGAAA	AGATCCAAAT	GGCATCGGAT	AATACCAATG	ATCTAATACA	7080
GTCAGGAGTG	AATACAAGGC	TTCTTACAAT	TCAGAGTCAT	GTCCAGAATT	ACATACCAAT	7140
ATCATTGACA	CAACAGATGT	CAGATCTTAG	GAAATTCATT	AGTGAAATTA	CAATTAGAAA	7200
TGATAATCAA	GAAGTGCTGC	CACAAAGAAT	AACACATGAT	GTAGGTATAA	AACCTTTAAA	7260
TCCAGATGAT	TTTTGGAGAT	GCACGTCTGG	TCTTCCATCT	TTAATGAAAA	CTCCAAAAAT	7320
AAGGTTAATG	CCAGGGCCGG	GATTATTAGC	TATGCCAACG	ACTGTTGATG	GCTGTGTTAG	7380
AACTCCGTCT	TTAGTTATAA	ATGATCTGAT	TTATGCTTAT	ACCTCAAATC	TAATTACTCG	7440
AGGTTGTCAG	GATATAGGAA	AATCATATCA	AGTCTTACAG	ATAGGGATAA	TAAGTGTAAA	7500
CTCAGACTTG	GTACCTGACT	TAAATCCTAG	GATCTCTCAT	ACCTTTAACA	TAAATGACAA	7560
TAGGAAGTCA	TGTTCTCTAG	CACTCCTAAA	TATAGATGTA	TATCAACTGT	GTTCAACTCC	7620
CAAAGTTGAT	GAAAGATCAG	ATTATGCATC	ATCAGGCATA	GAAGATATTG	TACTTGATAT	7680
TGTCAATTAT	GATGGTTCAA	TCTCAACAAC	AAGATTTAAG	AATAATAACA	TAAGCTTTGA	7740
TCAACCATAT	GCTGCACTAT	ACCCATCTGT	TGGACCAGGG	ATATACTACA	AAGGCAAAAT	7800
AATATTTCTC	GGGTATGGAG	GTCTTGAACA	TCCAATAAAT	GAGAATGTAA	TCTGCAACAC	7860
AACTGGGTGC	CCCGGGAAAA	CACAGAGAGA	CTGTAATCAA	GCATCTCATA	GTACTTGGTT	7920
TTCAGATAGG	AGGATGGTCA	ACTCCATCAT	TGTGGCTGAC	AAAGGCTTAA	ACTCAATTCC	7980
AAAATTGAAA	GTATGGACGA	TATCTATGCG	ACAAAATTAC	TGGGGGTCAG	AAGGAAGGTT	8040
ACTTCTACTA	GGTAACAAGA	TCTATATATA	TACAAGATCT	ACAAGTTGGC	ATAGCAAGTT	8100
ACAATTAGGA	ATAATTGATA	TTACTGATTA	CAGTGAATATA	AGGATAAAAT	GGACATGGCA	8160
TAATGTGCTA	TCAAGACCAG	GAAACAATGA	ATGTCCATGG	GGACATTCAT	GTCCAGATGG	8220
ATGTATAACA	GGAGTATATA	CTGATGCATA	TCCACTCAAT	CCCACAGGGA	GCATTGTGTC	8280
ATCTGTCATA	TTAGACTCAC	AAAAATCGAG	AGTGAACCCA	GTCATAACTT	ACTCAACAGC	8340
AACCGAAAGA	GTAAACGAGC	TGGCCATCCT	AAACAGAACA	CTCTCAGCTG	GATATACAAC	8400
AACAAGCTGC	ATTACACACT	ATAACAAAGG	ATATTGTTTT	CATATAGTAG	AAATAAATCA	8460
TAAAAGCTTA	AACACATTTC	AACCCATGTT	GTTCAAAACA	GAGATTCCAA	AAAGCTGCAG	8520
TTAATCATAA	TTAACCATAA	TATGCATCAA	TCTATCTATA	ATACAAGTAT	ATGATAAGTA	8580
ATCAGCAATC	AGACAATAGA	CAAAAGGGAA	ATATAAAAAA	CTTAGGAGCA	AAGCGTGTCT	8640
GGGAAATGGA	CACTGAATCT	AACAATGGCA	CTGTATCTGA	CATACTCTAT	CCTGAGTGTC	8700

ACCTTAACTC TCCTATCGTT AAAGGTAAAA TAGCACAATT ACACACTATT ATGAGTCTAC	8760
CTCAGCCTTA TGATATGGAT GACGACTCAA TACTAGTTAT CACTAGACAG AAAATAAAAC	8820
TTAATAAATT GGATAAAGA CAACGATCTA TTAGAAGATT AAAATTAATA TTAACGAAA	8880
AAGTGAATGA CTTAGGAAAA TACACATTTA TCAGATATCC AGAAATGTCA AAAGAAATGT	8940
TCAAATTATA TATACCTGGT ATTAACAGTA AAGTGACTGA ATTATTACTT AAAGCAGATA	9000
GAACATATAG TCAAATGACT GATGGATTAA GAGATCTATG GATTAATGTG CTATCAAAAT	9060
TAGCCTCAA AAATGATGGA AGCAATTATG ATCTTAATGA AGAAATTAAT AATATATCGA	9120
AAGTTCACAC AACCTATAAA TCAGATAAAT GGTATAATCC ATTCAAAACA TGGTTTACTA	9180
TCAAGTATGA TATGAGAAGA TTACAAAAAG CTCGAAATGA GATCACTTTT AATGTTGGGA	9240
AGGATTATAA CTTGTTAGAA GACCAGAAGA ATTTCTTATT GATACATCCA GAATTGGTTT	9300
TGATATTAGA TAAACAAAAC TATAATGGTT ATCTAATTAC TCCTGAATTA GTATTGATGT	9360
ATTGTGACGT AGTCGAAGGC CGATGGAATA TAAGTGCATG TGCTAAGTTA GATCCAAAAT	9420
TACAATCTAT GTATCAGAAA GGTAATAACC TGTGGGAAGT GATAGATAAA TTGTTTCCAA	9480
TTATGGGAGA AAAGACATTT GATGTGATAT CGTTATTAGA ACCACTTGCA TTATCCTTAA	9540
TTCAAACCTCA TGATCCTGTT AAACAACCTAA GAGGAGCTTT TTTAAATCAT GTGTTATCCG	9600
AGATGGAATT AATATTTGAA TCTAGAGAAT CGATTAAGGA ATTTCTGAGT GTAGATTACA	9660
TTGATAAAAT TTTAGATATA TTTAATAAGT CTACAATAGA TGAAATAGCA GAGATTTTCT	9720
CTTTTTTTAG AACATTTGGG CATCCTCCAT TAGAAGCTAG TATTGCAGCA GAAAAGGTTA	9780
GAAAATATAT GTATATTGGA AAACAATTAA AATTTGACAC TATTAATAAA TGTCATGCTA	9840
TCTTCTGTAC AATAATAATT AACGGATATA GAGAGAGGCA TGGTGGACAG TGGCCTCCTG	9900
TGACATTACC TGATCATGCA CACGAATTCA TCATAAATGC TTACGGTTCA AACTCTGCGA	9960
TATCATATGA AAATGCTGTT GATTATTACC AGAGCTTTAT AGGAATAAAA TTCAATAAAT	10020
TCATAGAGCC TCAGTTAGAT GAGGATTTGA CAATTTATAT GAAAGATAAA GCATTATCTC	10080
CAAAAAAATC AAATGGGAC ACAGTTTATC CTGCATCTAA TTTACTGTAC CGTACTAACG	10140
CATCCAACGA ATCACGAAGA TTAGTTGAAG TATTTATAGC AGATAGTAAA TTTGATCCTC	10200
ATCAGATATT GGATTATGTA GAATCTGGGG ACTGGTTAGA TGATCCAGAA TTTAATATTT	10260
CTTATAGTCT TAAAGAAAAA GAGATCAAAC AGGAAGGTAG ACTCTTTGCA AAAATGACAT	10320
ACAAAATGAG AGCTACACAA GTTTTATCAG AGACCCTACT TGCAAATAAC ATAGGAAAAT	10380
TCTTTCAAGA AAATGGGATG GTGAAGGGAG AGATTGAATT ACTTAAGAGA TTAACAACCA	10440
TATCAATATC AGGAGTTCCA CGGTATAATG AAGTGATCAA TAATFCTAAA AGCCATACAG	10500
ATGACCTTAA AACCTACAAT AAAATAAGTA ATCTTAATTT GTCTTCTAAT CAGAAATCAA	10560
AGAAATTTGA ATTCAAGTCA ACGGATATCT ACAATGATGG ATACGAGACT GTGAGCTGTT	10620
TCCTAACAA ACATCTCAAA AAATACTGTC TTAATTGGAG ATATGAATCA ACAGCTCTAT	10680
TTGGAGAAAC TTGCAACCAA ATATTTGGAT TAAATAAATT GTTTAATTGG TTACACCCTC	10740
GTCTTGAAGG AAGTACAATC TATGTAGGTG ATCCTTACTG TCCTCCATCA GATAAAGAAC	10800

ATATATCATT	AGAGGATCAC	CCTGATTCTG	GTTTTTACGT	TCATAACCCA	AGAGGGGGTA	10860
TAGAAGGATT	TTGTCAAAAA	TTATGGACAC	TCATATCTAT	AAGTGCAATA	CATCTAGCAG	10920
CTGTTAGAAT	AGGCGTGAGG	GTGACTGCAA	TGGTTCAAGG	AGACAATCAA	GCTATAGCTG	10980
TAACCACAAG	AGTACCCAAC	AATTATGACT	ACAGAGTTAA	GAAGGAGATA	GTTTATAAAG	11040
ATGTAGTGAG	ATTTTTTGAT	TCATTAAGAG	AAGTGATGGA	TGATCTAGGT	CATGAACTTA	11100
AATTAAATGA	AACGATTATA	AGTAGCAAGA	TGTTTCATATA	TAGCAAAAGA	ATCTATTATG	11160
ATGGGAGAAT	TCTTCCTCAA	GCTCTAAAAG	CATTATCTAG	ATGTGTCTTC	TGGTCAGAGA	11220
CAGTAATAGA	CGAAACAAGA	TCAGCATCTT	CAAATTTGGC	AACATCATTT	GCAAAAGCAA	11280
TTGAGAATGG	TTATTCACCT	GTTCTAGGAT	ATGCATGCTC	AATTTTTAAG	AATATTC AAC	11340
AACTATATAT	TGCCCTTGGG	ATGAATATCA	ATCCAAC TAT	AACACAGAAT	ATCAGAGATC	11400
AGTATTTTAG	GAATCCAAAT	TGGATGCAAT	ATGCCTCTTT	AATACCTGCT	AGTGTGGGG	11460
GATTCAATCA	CATGGCGATG	TCAAGATGTT	TTGTAAGGAA	TATTGGTGAT	CCATCAGTTG	11520
CCGCATTGGC	TGATATTAAA	AGATTTATTA	AGGCGAATCT	ATTAGACCGA	AGTGTCTTTT	11580
ATAGGATTAT	GAATCAAGAA	CCAGGTGAGT	CATCTTTTTT	TGATTGGGCT	TCAGATCCAT	11640
ATT CATGCAA	TTTACCACAA	TCTCAAAATA	TAACCACCAT	GATAAAAAAT	ATAACAGCAA	11700
GGAATGTATT	ACAAGATTCA	CCAAATCCAT	TATTATCTGG	ATTATTCACA	AATACAATGA	11760
TAGAAGAAGA	TGAAGAATTA	GCTGAGTTCC	TGATGGACAG	GAAGGTAATT	CTCCCTAGAG	11820
TTGCACATGA	TATTCTAGAT	AATTCTCTCA	CAGGAATTAG	AAATGCCATA	GCTGGAATGT	11880
TAGATACGAC	AAAATCACTA	ATTCGGGTTG	GCATAAATAG	AGGAGGACTG	ACATATAGTT	11940
TGTTGAGGAA	AATCAGTAAT	TACGATCTAG	TACAATATGA	AACACTAAGT	AGGACTTTGC	12000
GACTAATTGT	AAGTGATAAA	ATCAAGTATG	AAGATATGTG	TTCGGTAGAC	CTTGCCATAG	12060
CATTGCGACA	AAAGATGTGG	ATTCATTTAT	CAGGAGGAAG	GATGATAAGT	GGACTTGAAA	12120
CGCCTGACCC	ATTAGAATTA	CTATCTGGGG	TAGTAATAAC	AGGATCAGAA	CATTGTAAAA	12180
TATGTTATTC	TTCAGATGGC	ACAAACCCAT	ATACTTGGAT	GTATTTACCC	GGTAATATCA	12240
AAATAGGATC	AGCAGAAACA	GGTATATCGT	CATTAAGAGT	TCCTTATTTT	GGATCAGTCA	12300
CTGATGAAAG	ATCTGAAGCA	CAATTAGGAT	ATATCAAGAA	TCTTAGTAAA	CCTGCAAAAG	12360
CCGCAATAAG	AATAGCAATG	ATATATACAT	GGGCATTTGG	TAATGATGAG	ATATCTTGGA	12420
TGGAAGCCTC	ACAGATAGCA	CAAACACGTG	CAAATTTTAC	ACTAGATAGT	CTCAAAATTT	12480
TAACACCGGT	AGCTACATCA	ACAAATTTAT	CACACAGATT	AAAGGATACT	GCAACTCAGA	12540
TGAAATTCTC	CAGTACATCA	TTGATCAGAG	TCAGCAGATT	CATAACAATG	TCCAATGATA	12600
ACATGTCTAT	CAAAGAAGCT	AATGAAACCA	AAGATACTAA	TCTTATTTAT	CAACAAATAA	12660
TGTTAACAGG	ATTAAGTGTT	TTGGAATATT	TATTTAGATT	AAAAGAAACC	ACAGGACACA	12720
ACCTATAGT	TATGCATCTG	CACATAGAAG	ATGAGTGTG	TATTAAAGAA	AGTTTTAATG	12780
ATGAACATAT	TAATCCAGAG	TCTACATTAG	AATTAATTGG	ATATCCTGAA	AGTAATGAAT	12840
TTATTTATGA	TAAAGACCCA	CTCAAAGATG	TGGACTTATC	AAAACTTATG	GTTATTAAAG	12900

ACCATTCTTA	CACAATTGAT	ATGAATTATT	GGGATGATAC	TGACATCATA	CATGCAATTT	12960
CAATATGTAC	TGCAATTACA	ATAGCAGATA	CTATGTCACA	ATTAGATCGA	GATAATTTAA	13020
AAGAGATAAT	AGTTATTGCA	AATGATGATG	ATATTAATAG	CTTAATCACT	GAATTTTTGA	13080
CTCTTGACAT	ACTTGTATTT	CTCAAGACAT	TTGGTGGATT	ATTAGTAAAT	CAATTTGCAT	13140
ACACTCTTTA	TAGTCTAAAA	ATAGAAGGTA	GGGATCTCAT	TTGGGATTAT	ATAATGAGAA	13200
CACTGAGAGA	TACTTCCCAT	TCAATATTAA	AAGTATTATC	TAATGCATTA	TCTCATCCTA	13260
AAGTATTCAA	GAGGTTCTGG	GATTGTGGAG	TTTAAACCC	TATTTATGGG	CCTAATATCG	13320
CTAGTCAAGA	CCAGATAAAA	CTTGCCCTAT	CTATATGTGA	ATATTCACTA	GATCTATTTA	13380
TGAGAGAATG	GTTGAATGGT	GTATCACTTG	AAATATACAT	TTGTGACAGC	GATATGGAAG	13440
TTGCAAATGA	TAGGAAACAA	GCCTTTATTT	CTAGACACCT	TTCATTTGTT	TGTTGTTTAG	13500
CAGAAATTGC	ATCTTTCGGA	CCTAACCTGT	TAAACTTAAC	ATACTTGGAG	AGACTTGATC	13560
TATTGAAACA	ATATCTTGAA	TTAAATATTA	AAGAAGACCC	TACTCTTAAA	TATGTACAAA	13620
TATCTGGATT	ATTAATTAAA	TCGTTCCCAT	CAACTGTAAC	ATACGTAAGA	AAGACTGCAA	13680
TCAAATATCT	AAGGATTCGC	GGTATTAGTC	CACCTGAGGT	AATTGATGAT	TGGGATCCGG	13740
TAGAAGATGA	AAATATGCTG	GATAACATTG	TCAAACTAT	AAATGATAAC	TGTAATAAAG	13800
ATAATAAAGG	GAATAAAATT	AACAATTTCT	GGGGACTAGC	ACTTAAGAAC	TATCAAGTCC	13860
TTAAAATCAG	ATCTATAACA	AGTGATTCTG	ATGATAATGA	TAGACTAGAT	GCTAATACAA	13920
GTGGTTTGAC	ACTTCCTCAA	GGAGGGAATT	ATCTATCGCA	TCAATTGAGA	TTATTTCGGAA	13980
TCAACAGCAC	TAGTTGTCTG	AAAGCTCTTG	AGTTATCACA	AATTTTAATG	AAGGAAGTCA	14040
ATAAAGACAA	GGACAGGCTC	TTCTTGGGAG	AAGGAGCAGG	AGCTATGCTA	GCATGTTATG	14100
ATGCCACATT	AGGACCTGCA	GTTAATTATT	ATAATTCAGG	TTTGAATATA	ACAGATGTAA	14160
TTGGTCAACG	AGAATTGAAA	ATATTTCCCT	CAGAGGTATC	ATTAGTAGGT	AAAAAATTAG	14220
GAAATGTGAC	ACAGATTCTT	AACAGGGTAA	AAGTACTGTT	CAATGGGAAT	CCTAATTCAA	14280
CATGGATAGG	AAATATGGAA	TGTGAGAGCT	TAATATGGAG	TGAATTAAAT	GATAAGTCCA	14340
TTGGATTAGT	ACATTGTGAT	ATGGAAGGAG	CTATCGGTAA	ATCAGAAGAA	ACTGTTCTAC	14400
ATGAACATTA	TAGTGTTATA	AGAATTACAT	ACTTGATTGG	GGATGATGAT	GTTGTTTTAG	14460
TTTCCAAAAT	TATACCTACA	ATCACTCCGA	ATTGGTCTAG	AATACTTTAT	CTATATAAAT	14520
TATATTGGAA	AGATGTAAGT	ATAATATCAC	TCAAACTTC	TAATCCTGCA	TCAACAGAAT	14580
TATATCTAAT	TTCGAAAGAT	GCATATTGTA	CTATAATGGA	ACCTAGTGAA	ATTGTTTTAT	14640
CAAACTTAA	AAGATTGTCA	CTCTTGAAG	AAAATAATCT	ATTAAAAATG	ATCATTTTAT	14700
CAAAGAAGAG	GAATAATGAA	TGGTTACATC	ATGAAATCAA	AGAAGGAGAA	AGAGATTATG	14760
GAATCATGAG	ACCATATCAT	ATGGCACTAC	AAATCTTTGG	ATTCAAATC	AATTTAAATC	14820
ATCTGGCGAA	AGAATTTTTA	TCAACCCAG	ATCTGACTAA	TATCAACAAT	ATAATCCAAA	14880
GTTTTTCAGCG	AACAATAAAG	GATGTTTTAT	TTGAATGGAT	TAATATAACT	CATGATGATA	14940
AGAGACATAA	ATTAGGCCGA	AGATATAACA	TATTCCCACT	GAAAAATAAG	GGAAAGTTAA	15000

GACTGCTATC	GAGAAGACTA	GTATTAAGTT	GGATTTTCATT	ATCATTATCG	ACTCGATTAC	15060
TTACAGGTCG	CTTTCCTGAT	GAAAAATTTG	AACATAGAGC	ACAGACTGGA	TATGTATCAT	15120
TAGCTGATAC	TGATTTAGAA	TCATTAAAGT	TATTGTCGAA	AAACATCATT	AAGAATTACA	15180
GAGAGTGTAT	AGGATCAATA	TCATATTGGT	TTCTAACCAA	AGAAGTTAAA	ATACTTATGA	15240
AATTGATCGG	TGGTGCTAAA	TTATTAGGAA	TTCCAGACA	ATATAAGAA	CCCGAAGACC	15300
AGTTATTAGA	AAACTACAAT	CAACATGATG	AATTTGATAT	CGATTAAAAC	ATAAATACAA	15360
TGAAGATATA	TCCTAACCTT	TATCTTTAAG	CCTAGGAATA	GACAAAAAGT	AAGAAAAACA	15420
TGTAATATAT	ATATACCAA	CAGAGTTCTT	CTCTGTTTG	GT		15462

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 46:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 46:
- 15 TTGTCTGGGA AT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 47:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 47:
- 30 TTGCCTGGGA AT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 48:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 48:
- TTGTTTGGGA AT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 49:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 49:
TTGTCTGGTA AT 12

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 50:
AACTTTAAAT TA 12

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 51:
AACTTAAAT TA 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 52:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 52:
TTAAAGACAT TG 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 53:

TTTAAGACAT TG 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 54:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 54:
15 GCAGATGTCA AG 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 55:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 55:
30 GCAGATGCCA AG 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 56:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 56:
CGAATCTAAA GA 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 57:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 57:
CGAAGCTAAA GA 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 58:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
109

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 58:
GAAATATTGA TC 12

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 59:
GAAACATTGA TC 12

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 60:
TCTCTACCCA AC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 61:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 61:
TCGTTAACCA AC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 62:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 62:

AGTACAATAG GT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 63:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 63:
AGTACTGTGG GT 12
- 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 64:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 64:
GCACTTGATC CA 12
- 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 65:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 65:
AACTGGATC CA 12
- 45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 66:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 50
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 66:
CCATCATTGT TGTGACAA 19
- 55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 67:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 67:
CCATCATTGT GGCTGACAA 19

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 68:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 11 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 68:
TTACATGGCC A 11

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 11 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 69:
TCACATGGCG A 11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 70:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 70:
TTTGACTGG GC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 71:

TTTTGATTGG GC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 72:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 72:
15 GGCCTAATA CT 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 73:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 73:
30 GGGCCTAATA TC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 74:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 38 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 74:
CCATAGAGAG TCCATGGAAA GCGACGCTAA AAACATC 38
- 45

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polinucleotídica aislada que comprende un promotor de la transcripción unido operativamente, una secuencia polinucleotídica que codifica un genoma o antígeno de PIV y un terminador de la transcripción, en la que dicha secuencia polinucleotídica que codifica dicho genoma o antígeno de PIV se selecciona del grupo que consiste en: SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15, o la secuencia complementaria de las mismas, y está modificada por introducción de una secuencia de PIV heteróloga seleccionada de una secuencia de HPIV1, una secuencia de HPIV2 o una secuencia de BPIV para formar un genoma o antígeno de PIV quimérico.
2. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 1, en la que la secuencia polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno incorpora un gen o segmento génico de BPIV.
3. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 1, que incorpora una secuencia heteróloga de un virus respiratorio sincitial o virus del sarampión.
4. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido que codifica el genoma o antígeno de PIV quimérico está modificado adicionalmente por una inserción, reorganización, delección o sustitución de nucleótido que especifica una alteración fenotípica seleccionada de atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador o un cambio en un epítipo inmunogénico de PIV.
5. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el genoma o antígeno de PIV codifica una partícula de PIV infecciosa.
6. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 4 ó 5, en la que dicha secuencia polinucleotídica que codifica dicho genoma o antígeno de PIV incorpora una o más mutaciones de JS cp45.
7. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 4 ó 5, en la que dicha secuencia polinucleotídica que codifica dicho genoma o antígeno de PIV incorpora una mutación estabilizada por múltiples sustituciones de nucleótidos en un codón que especifica la mutación.
8. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 4 ó 5, en la que dicho genoma o antígeno quimérico incorpora múltiples mutaciones, especificando cada una un fenotipo seleccionado de atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas o restricción del intervalo de hospedador.
9. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 4 ó 5, en la que una mutación que especifica una alteración fenotípica seleccionada de atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador o un cambio en un epítipo inmunogénico de PIV se incorpora en un fondo de PIV quimérico, que comprende un genoma o antígeno que tiene uno o más de un gen o segmento génico de glicoproteína HN o F de PIV3 sustituido por uno o más genes o segmentos genómicos homólogos de glicoproteína HN y F de PIV1 o PIV2.
10. La molécula polinucleotídica aislada de la reivindicación 4 ó 5, que incorpora una secuencia reguladora de acción en cis de HPIV1, HPIV2 o BPIV.
11. La molécula polinucleotídica aislada de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que incorpora una secuencia heteróloga de un virus respiratorio sincitial o virus del sarampión.
12. La molécula polinucleotídica aislada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incorpora una secuencia polinucleotídica que codifica una molécula distinta de PIV seleccionada de una citocina, un epítipo T auxiliar, un marcador de sitio de restricción o una proteína de un patógeno microbiano capaz de generar una respuesta inmune protectora en un hospedador mamífero.
13. Una célula o composición sin células que incluye un vector de expresión que comprende una molécula polinucleotídica aislada que codifica un genoma o antígeno de PIV y un vector de expresión que comprende una o más moléculas polinucleotídicas aisladas que codifican proteínas N, P y L de PIV, en la que la molécula polinucleotídica que codifica dicho genoma o antígeno de PIV se selecciona del grupo que consiste en: SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15, o la secuencia complementaria de las mismas, y está modificada por introducción de una secuencia de PIV heteróloga seleccionada de una secuencia de HPIV1, una secuencia de HPIV2 o una secuencia de BPIV para formar un genoma o antígeno de PIV quimérico, de manera que la expresión de dicho genoma o antígeno de PIV y proteínas N, P y L produce una partícula de PIV infecciosa.
14. La célula o composición sin células de la reivindicación 13, en la que la partícula de PIV infecciosa es un virus.

15. La célula o composición sin células de la reivindicación 13, en la que la partícula de PIV infecciosa es una partícula subviral.

16. Un método para producir una partícula de PIV infecciosa a partir de una o más moléculas polinucleotídicas
5 aisladas que codifican dicho PIV, que comprende: coexpresar en una célula o sistema sin células un vector de expresión que comprende una molécula polinucleotídica que codifica un genoma o antígeno de PIV y un vector de expresión que comprende una o más moléculas polinucleotídicas que codifican proteínas N, P y L, produciendo de este modo una partícula de PIV infecciosa en la que la molécula polinucleotídica que codifica dicho genoma o antígeno de PIV se selecciona del grupo que consiste en: SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15, o la
10 secuencia complementaria de las mismas, y está modificada por introducción de una secuencia de PIV heteróloga seleccionada de una secuencia de HPIV1, una secuencia de HPIV2 o una secuencia de BPIV para formar un genoma o antígeno de PIV quimérico.

17. El método de la reivindicación 16, en el que la molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de
15 PIV es ADNc.

18. El método de la reivindicación 16, en el que la partícula de PIV infecciosa es un virus.

19. El método de la reivindicación 16, en el que la partícula de PIV infecciosa es una partícula subviral.
20

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que la molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de PIV quimérico es una quimera de secuencias de PIV humanas y bovinas.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que la molécula polinucleotídica que codifica el
25 genoma o antígeno de PIV incorpora además una mutación atenuante de una cepa de PIV derivada biológicamente.

22. El método de la reivindicación 21, en el que la molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de PIV incorpora al menos una mutación de JS cp45.
30

23. El método de la reivindicación 21 ó 22, en el que dicha molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de PIV incorpora una mutación que se estabiliza por múltiples sustituciones de nucleótidos en un codón que especifica la mutación.

35 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que una secuencia heteróloga de HPIV1 o HPIV2 que codifica un gen o segmento génico de una glicoproteína HN o F sustituye a un gen o segmento génico correspondiente de HPIV3.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que dicho genoma o antígeno quimérico
40 incorpora múltiples mutaciones, especificando cada una un fenotipo seleccionado de atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas o restricción del intervalo de hospedador.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en el que dicha molécula polinucleotídica que codifica dicho genoma o antígeno de PIV incorpora una secuencia heteróloga de un virus respiratorio sincitial o virus del
45 sarampión.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, en el que la molécula polinucleotídica que codifica el genoma o antígeno de PIV está modificada para codificar una molécula distinta de PIV seleccionada de una citocina, un epítipo T auxiliar, un marcador de sitio de restricción o una proteína de un patógeno microbiano capaz
50 de generar una respuesta inmune protectora en un hospedador mamífero.

28. Una partícula de PIV infecciosa, que comprende un genoma o antígeno de PIV recombinante, una proteína N, una proteína P y una proteína L, en la que el genoma o antígeno de PIV recombinante se selecciona del grupo que consiste en: SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15, o la secuencia complementaria de las mismas, y está
55 modificado por introducción de una secuencia de PIV heteróloga seleccionada de una secuencia de HPIV1, una secuencia de HPIV2 o una secuencia de BPIV para formar un genoma o antígeno de PIV quimérico.

29. La partícula de PIV infecciosa de la reivindicación 28, que es una partícula subviral.

60 30. La partícula de PIV infecciosa de la reivindicación 28, que es un virus.

31. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en la que el genoma o antígeno de PIV recombinante incorpora una secuencia heteróloga de RSV o virus del sarampión.

32. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, en la que el genoma o antígeno de PIV recombinante comprende además una inserción, reorganización, delección o sustitución de nucleótido que especifica una alteración fenotípica seleccionada de atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador o un cambio en un epítipo inmunogénico de PIV.
33. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, en la que el genoma o antígeno de PIV recombinante incorpora al menos una mutación de JS cp45.
34. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, en la que una mutación que especifica una alteración fenotípica seleccionada de atenuación, termosensibilidad, adaptación al frío, pequeño tamaño de placas, restricción del intervalo de hospedador o un cambio en un epítipo inmunogénico de PIV está incorporada en un fondo de PIV quimérico que comprende un genoma o antígeno que tiene uno o más genes o segmentos génicos de glicoproteína HN o F de PIV3 sustituido por uno o más genes o segmentos génicos homólogos de glicoproteína HN y F de PIV1 o PIV2.
35. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34, en la que el genoma o antígeno de PIV recombinante está modificado para codificar una molécula distinta de PIV seleccionada de una citocina, un epítipo T auxiliar, un marcador de sitio de restricción o una proteína de un patógeno microbiano capaz de generar una respuesta inmune protectora en un hospedador mamífero.
36. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 35, en la que el genoma o antígeno de PIV quimérico comprende además un polinucleótido que codifica un antígeno o epítipo de RSV que genera una inmunidad protectora contra RSV en un hospedador inmunizado.
37. La partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 35, en la que el genoma o antígeno de PIV quimérico comprende además un polinucleótido que codifica un antígeno o epítipo del virus del sarampión.
38. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de una partícula de PIV infecciosa de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

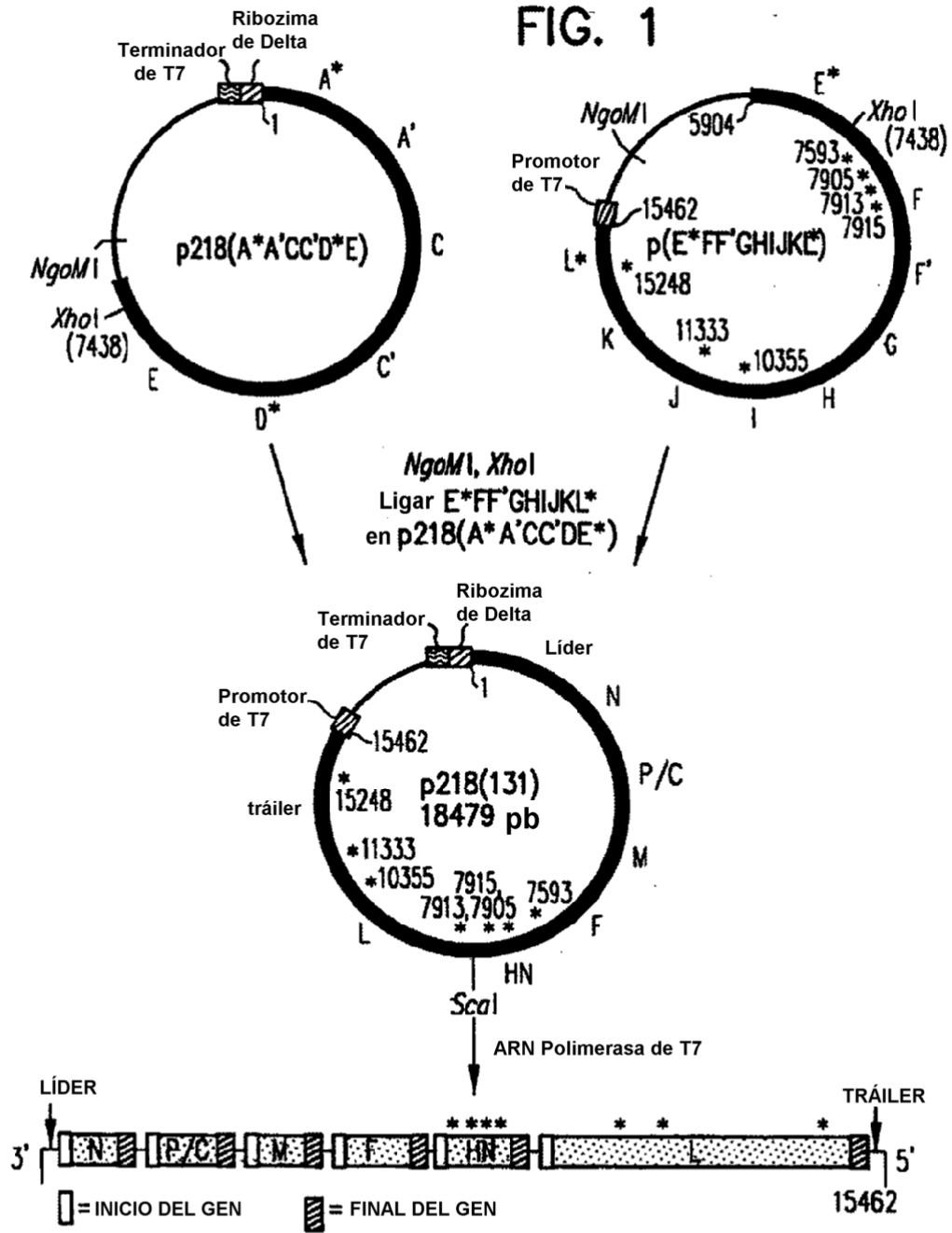


FIG. 14

FIG. 14A
FIG. 14B

FIG. 2

1) Mutaciones Introducidas y Accidentales en el gen de HN de ADNc de JS [p218(131)]			
JSwt parental	THR263 AAT ACA GAT	HgaI CAA GCG TCT CAT	PRO370 AGT CCA TGG TTT
JSdDNA	7589AAT ATA GAT ILE263	7898CAA GCA TCT CAT	AGT ACG TGG TTT ScaI THR370
2) Mutaciones Accidentales en el Gen de L de ADNc de JS [p218(131)]			
JSwt parental	THR595 GCT ACA CAA	ASN618 AAG AAC ATT	ILE2221 TTG ATT GGT
JSdDNA	10350 GCT ACC CAA THR595	11328 AAG AAT ATT ASN618	15243 TTG ATG GGT ILE2221

FIG. 15A

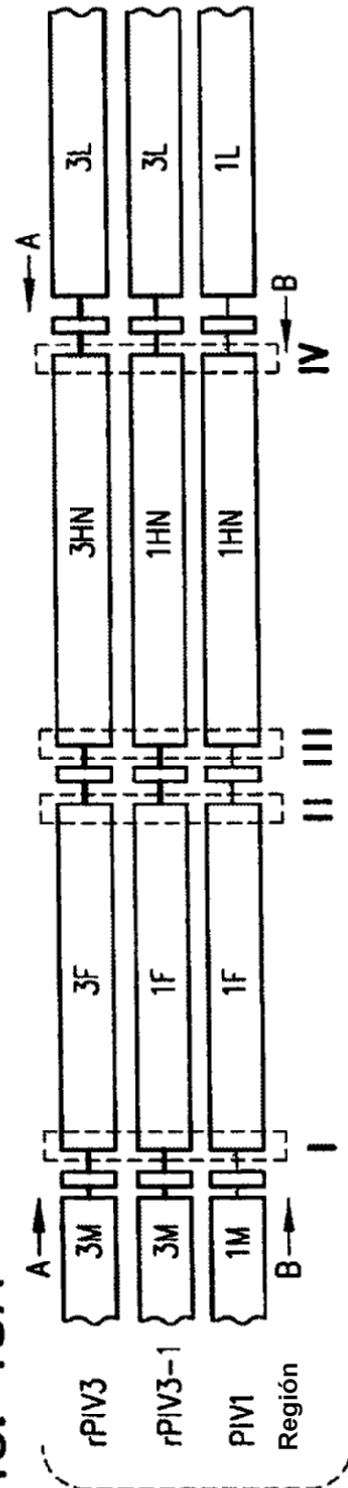


FIG. 3

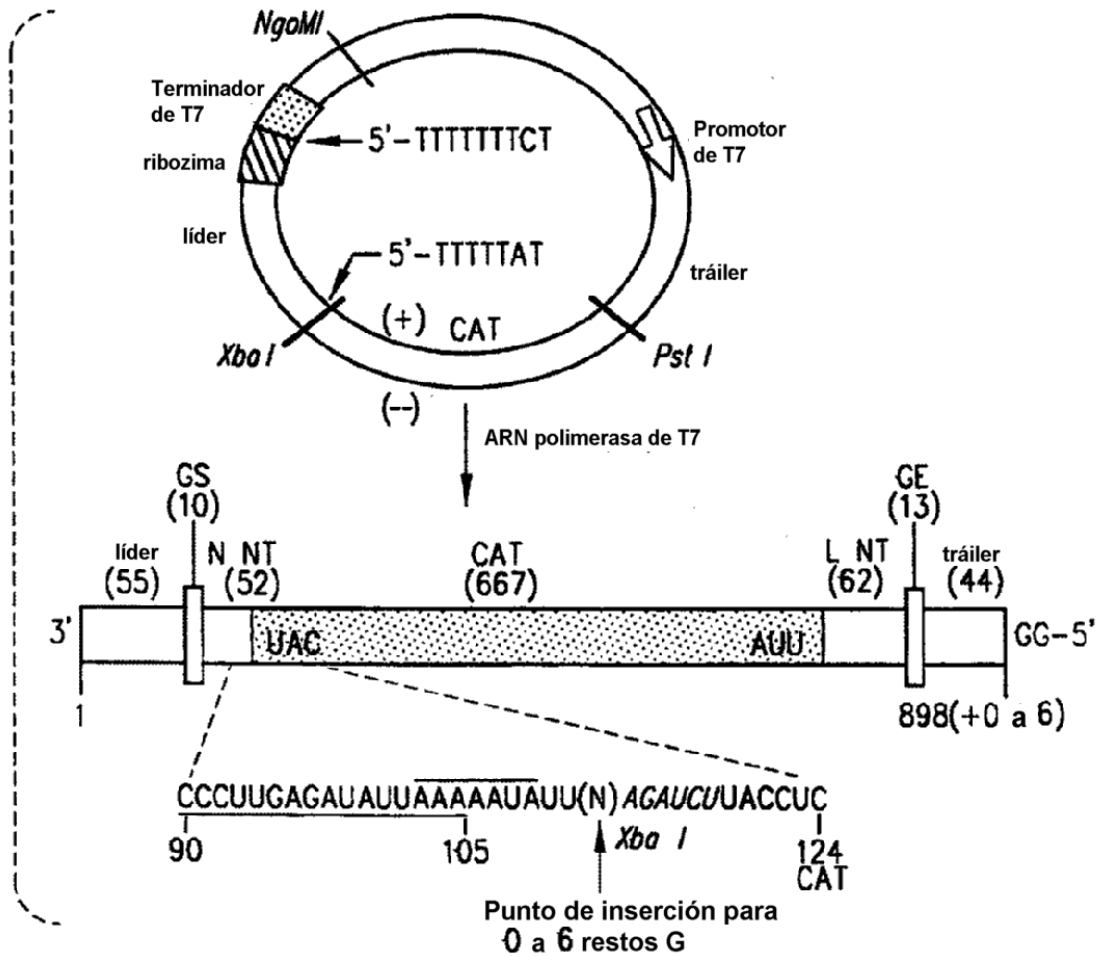


FIG. 4

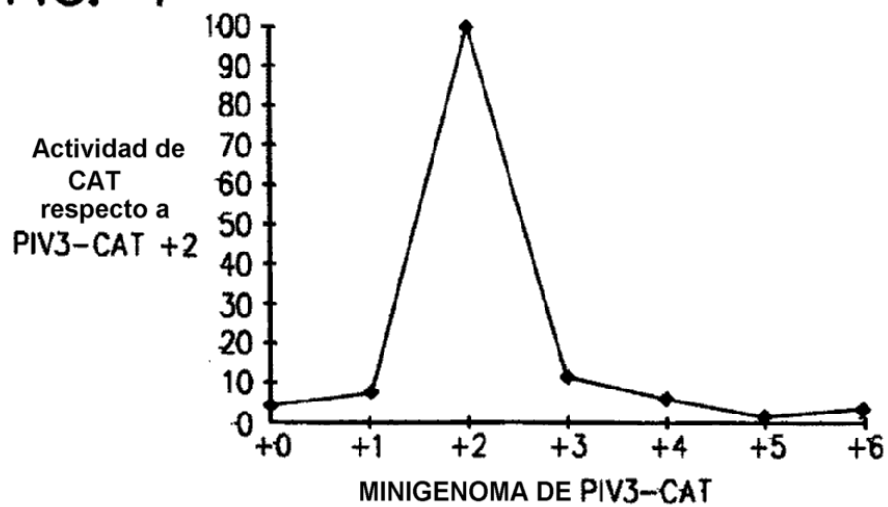


FIG. 5A

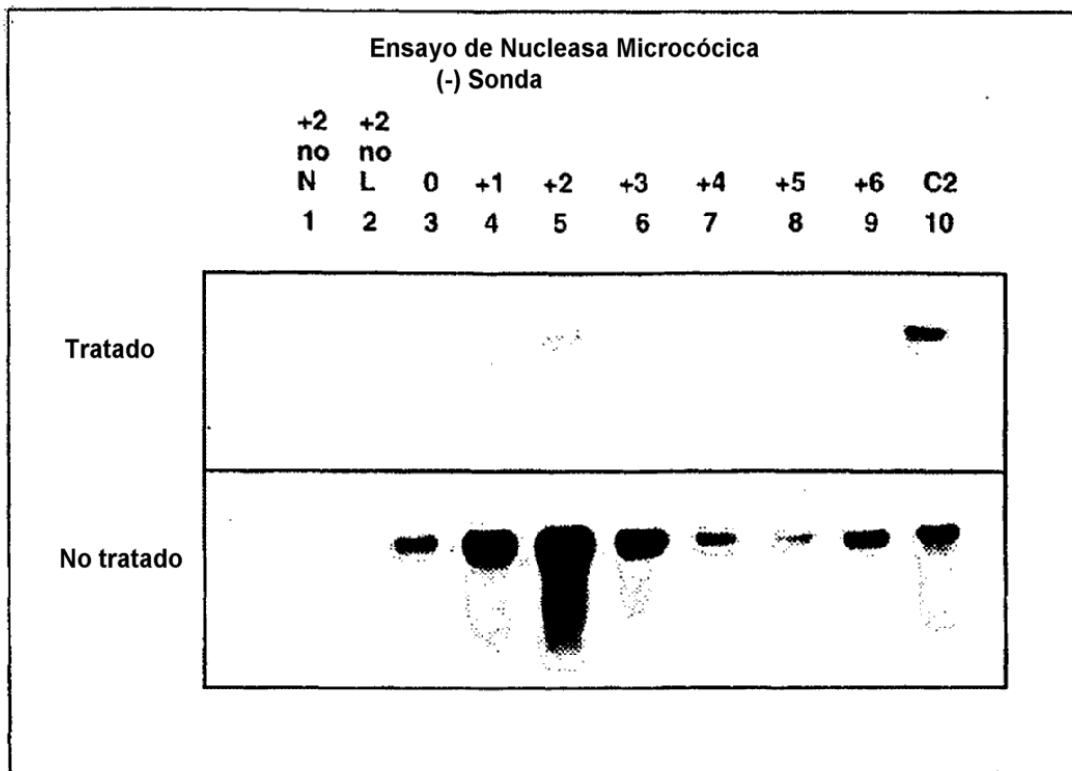


FIG. 5B

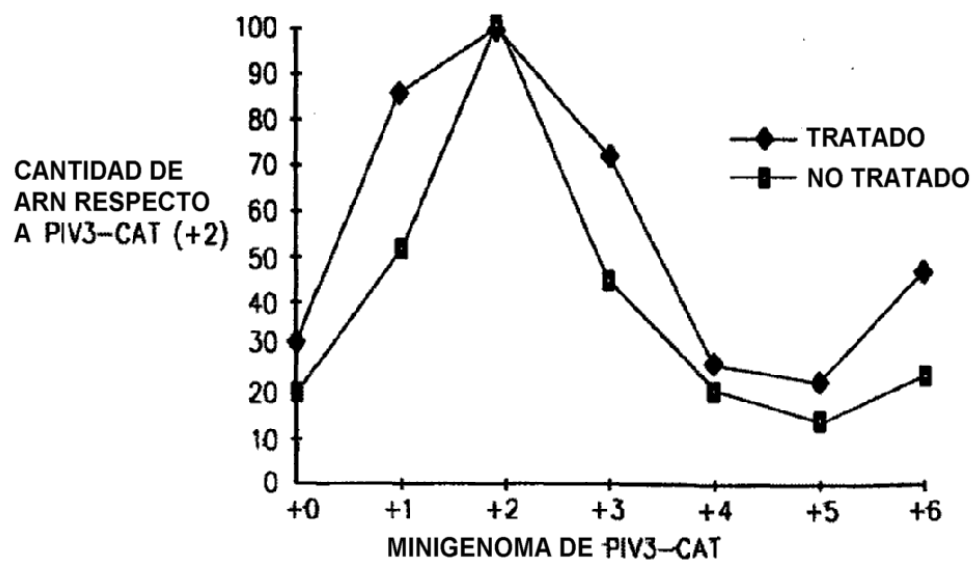


FIG. 6A

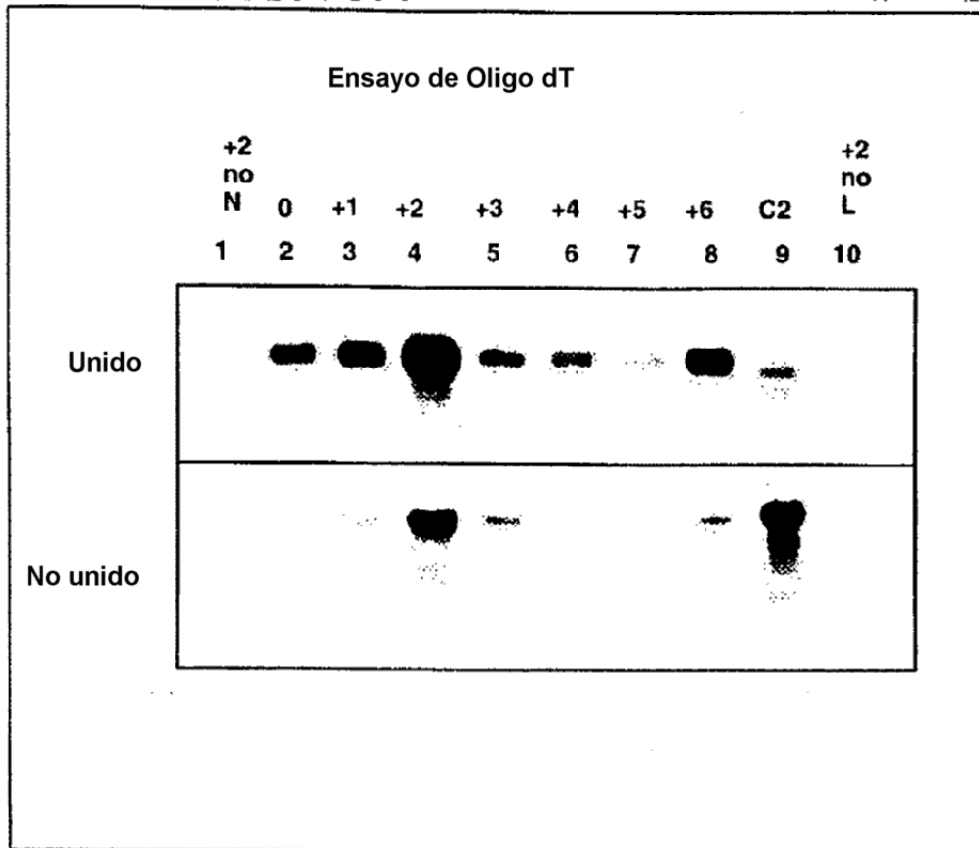


FIG. 6B

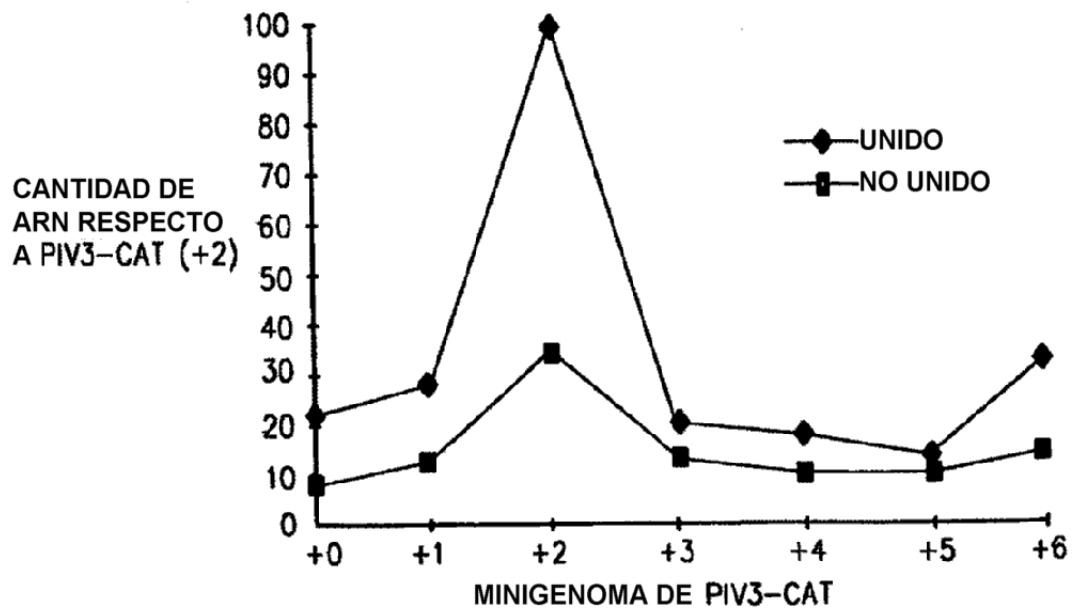


FIG. 7A

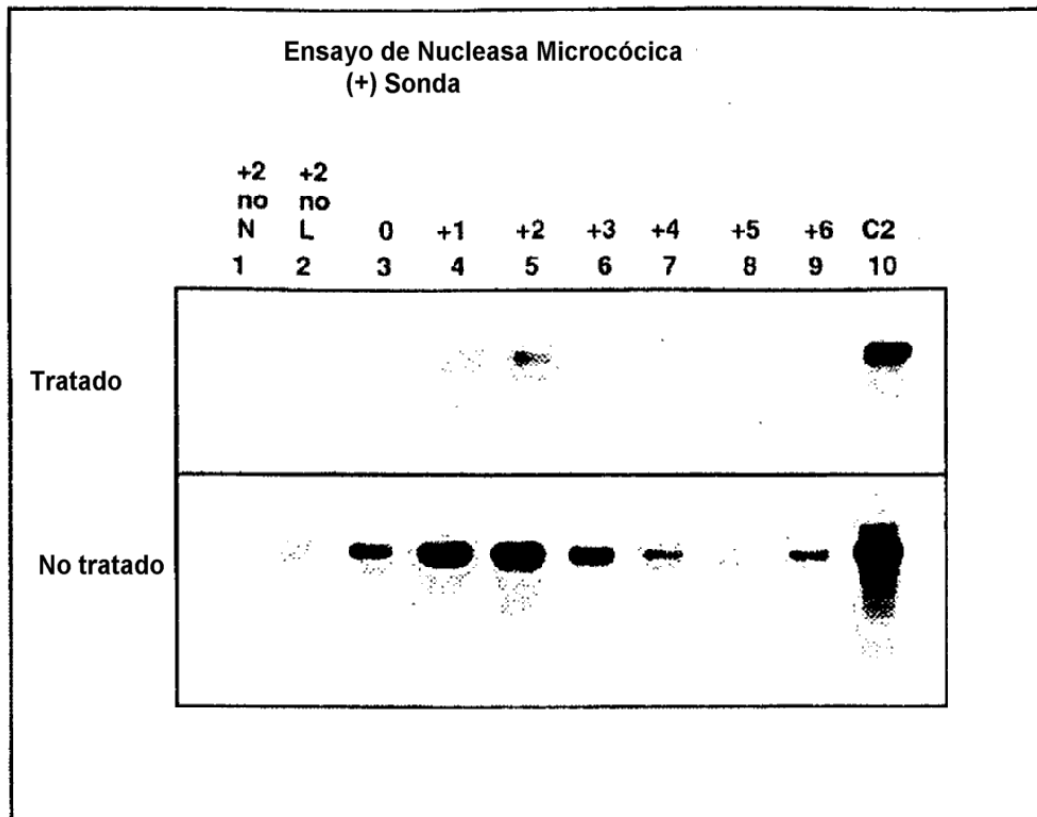


FIG. 7B

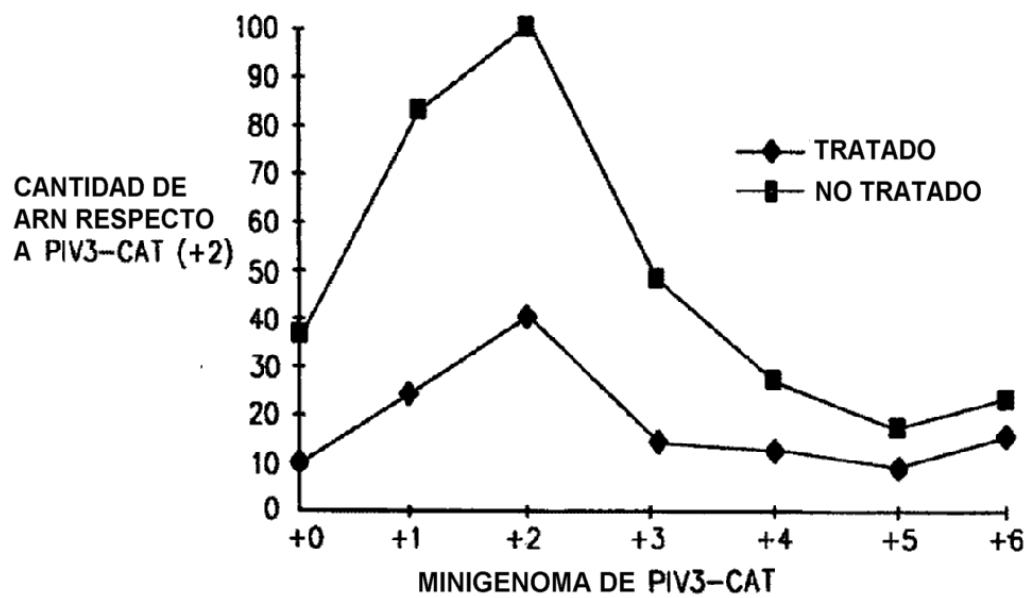


FIG. 8

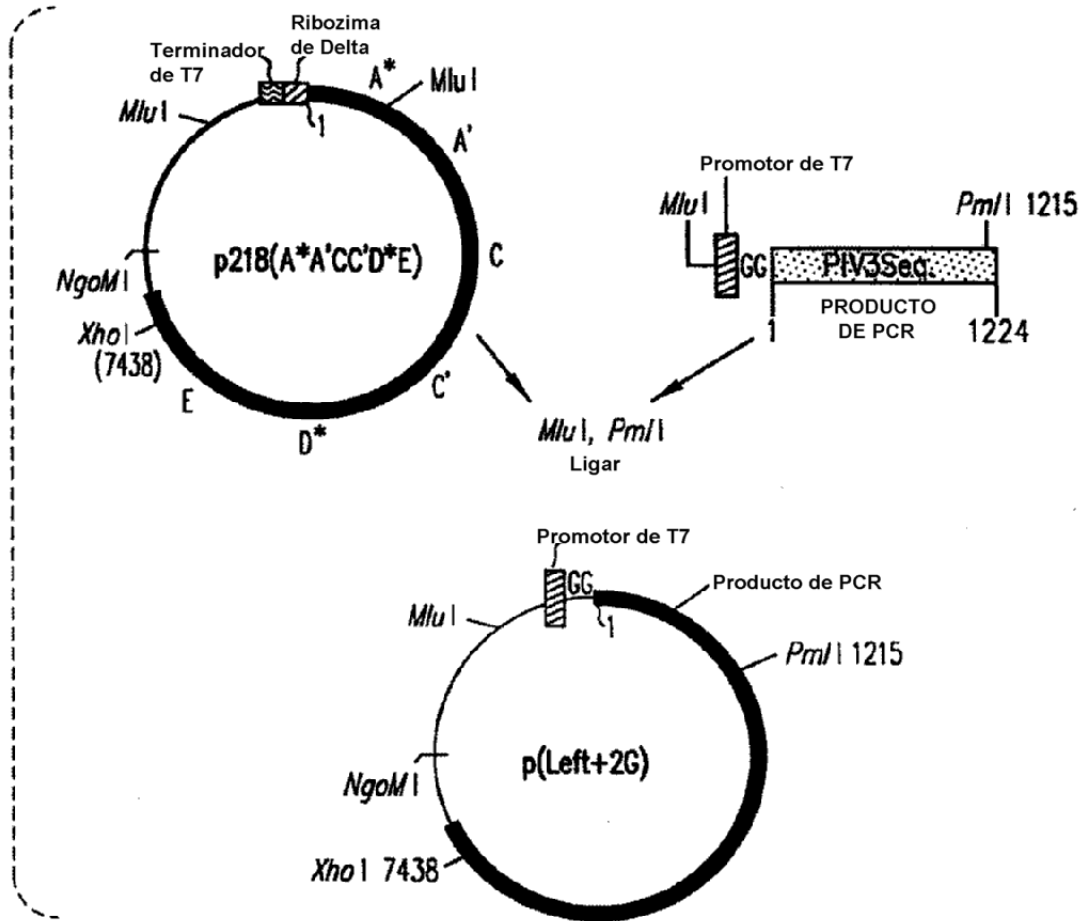


FIG. 12

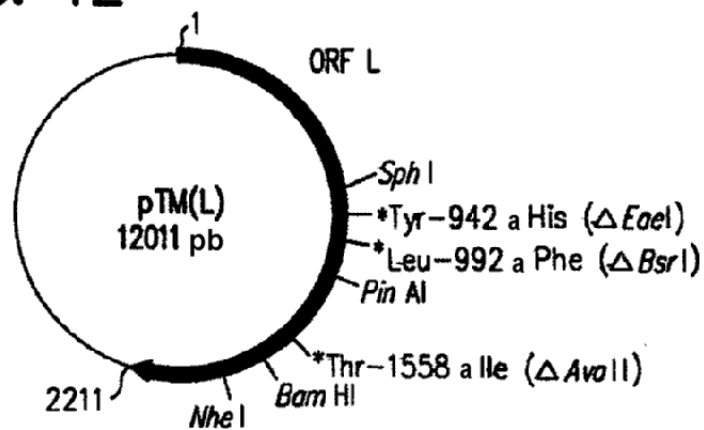


FIG. 9

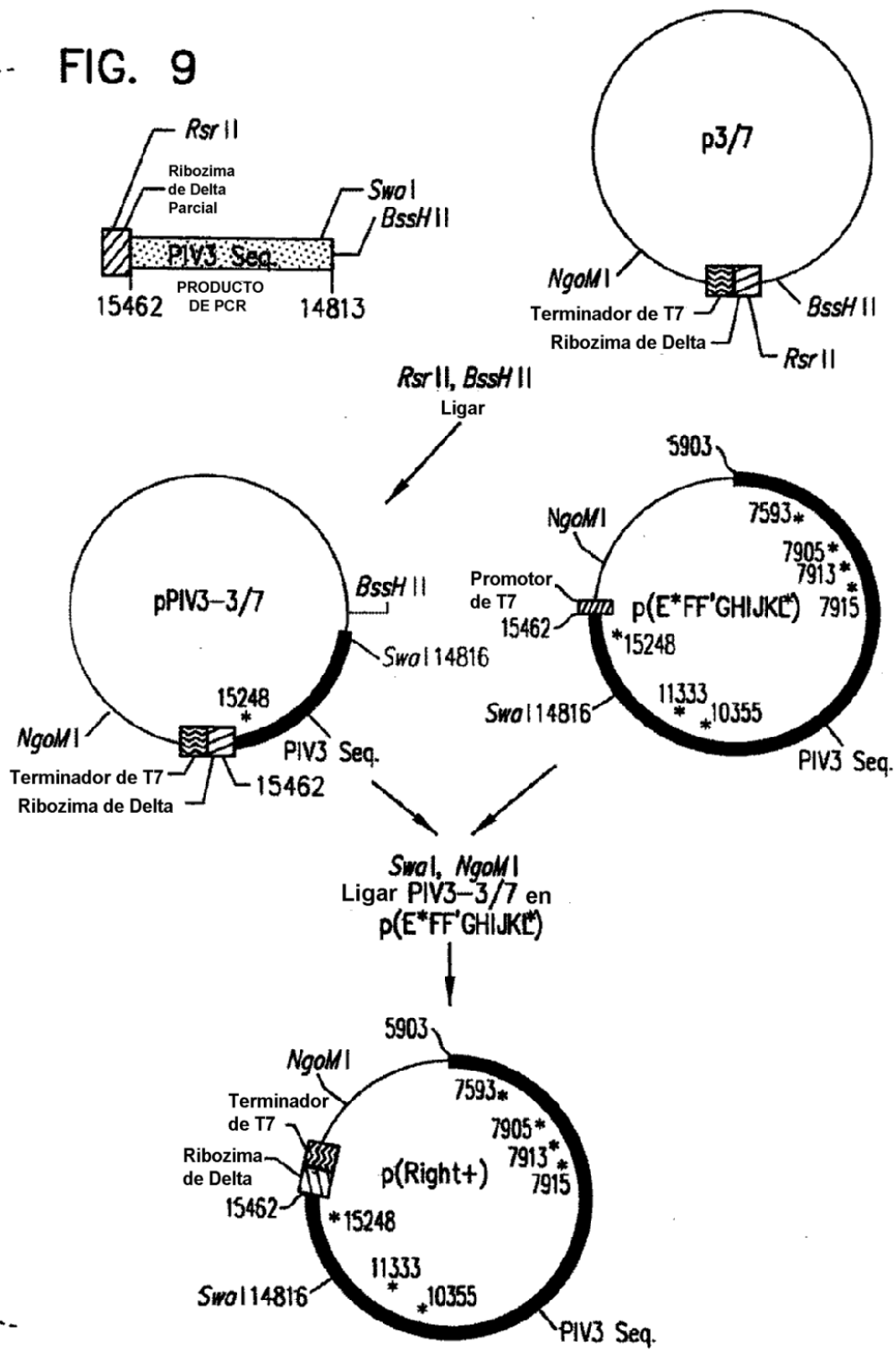


FIG. 10

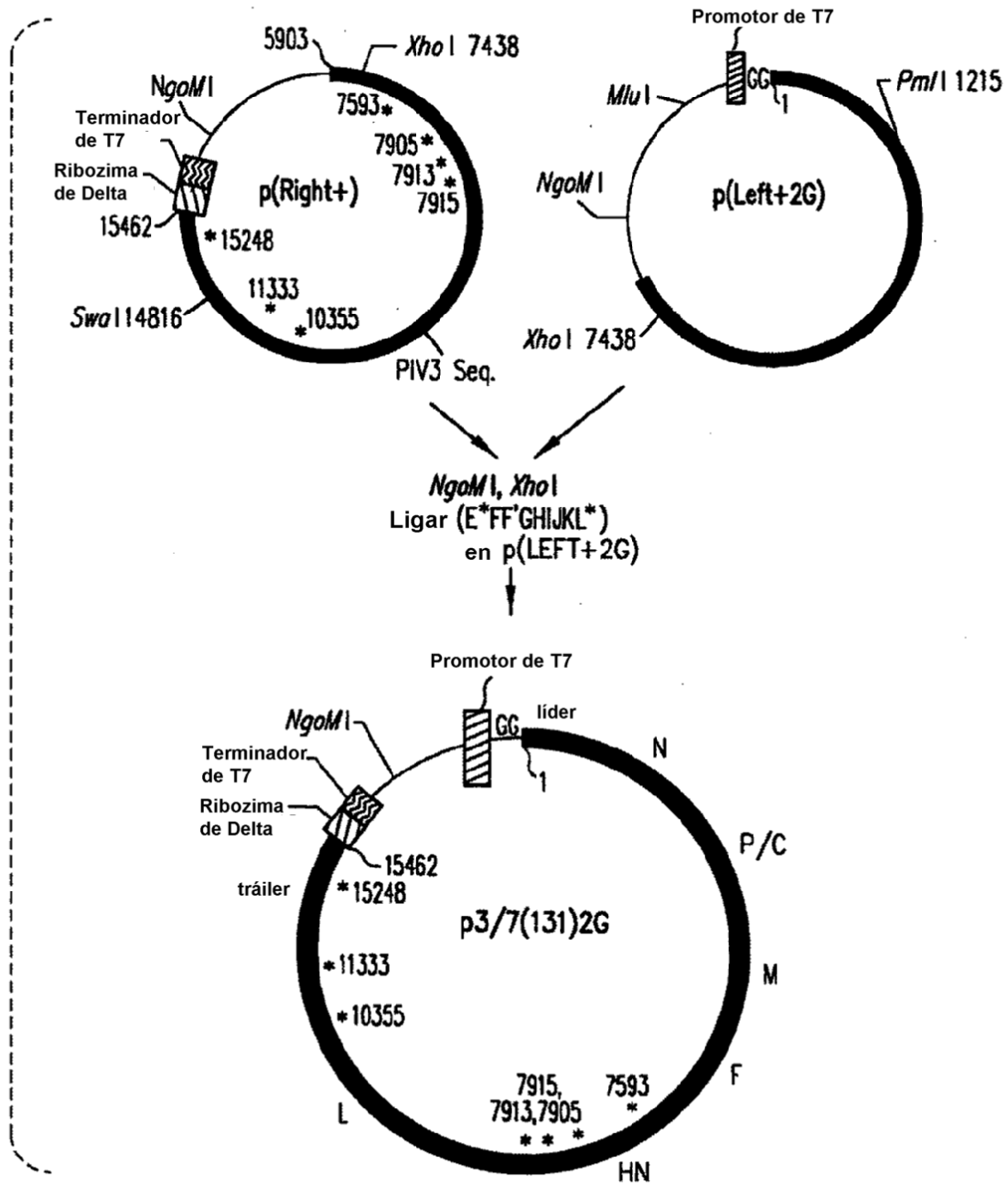


FIG. 11

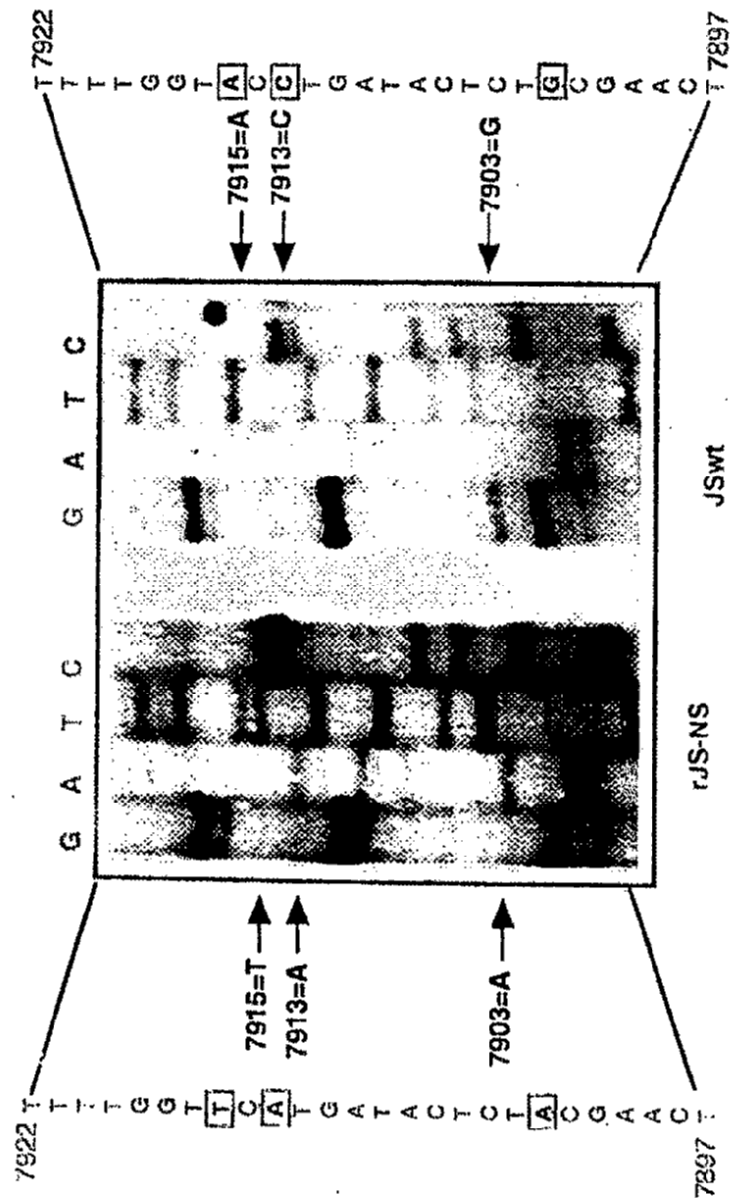


FIG. 13

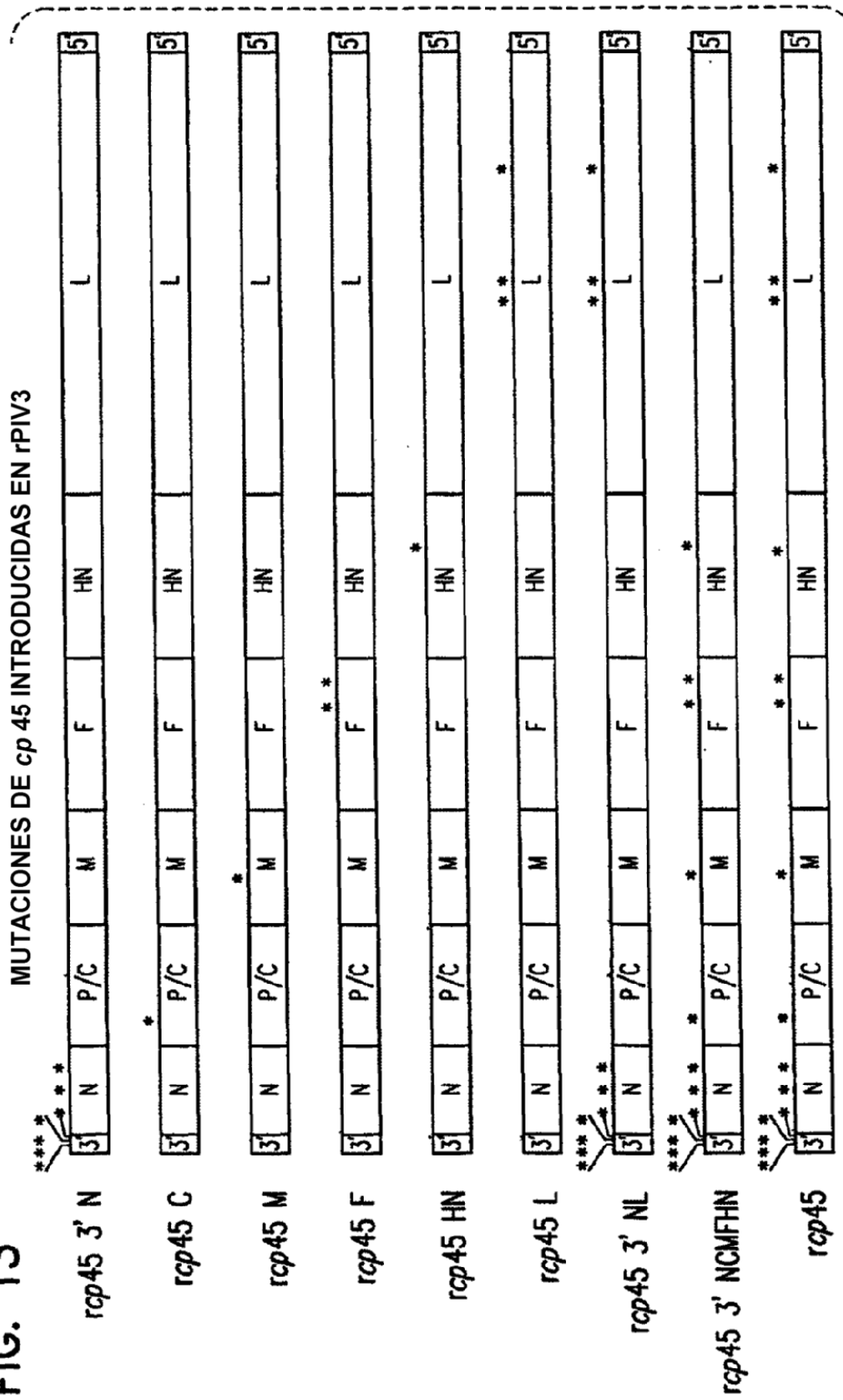
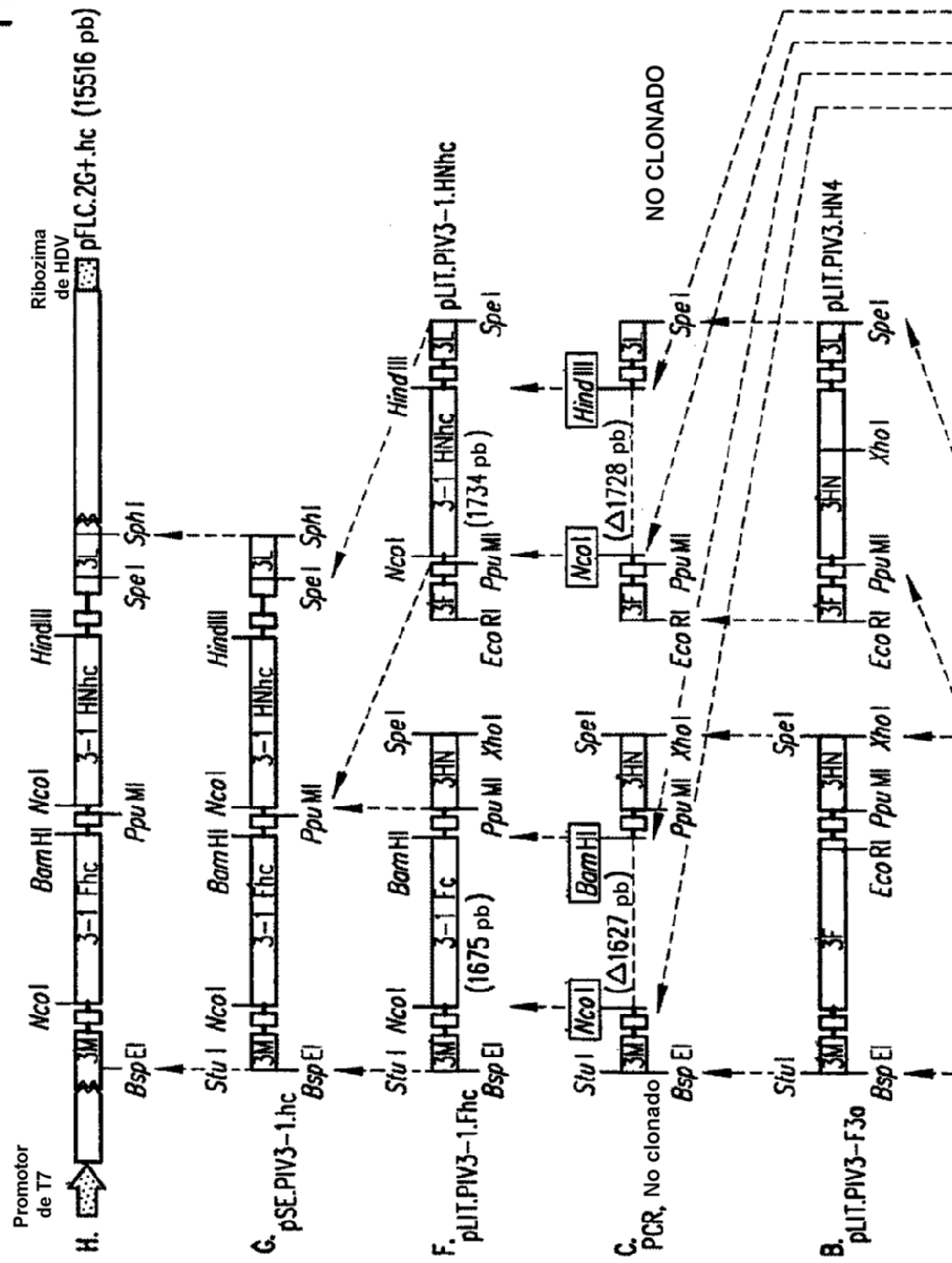


Figura 1: Representación esquemática de virus PIV3 recombinantes que llevan mutaciones (*) en el líder 3', inicio del gen de N, proteínas N, C, M, F, HN y/o L.

FIG. 14A



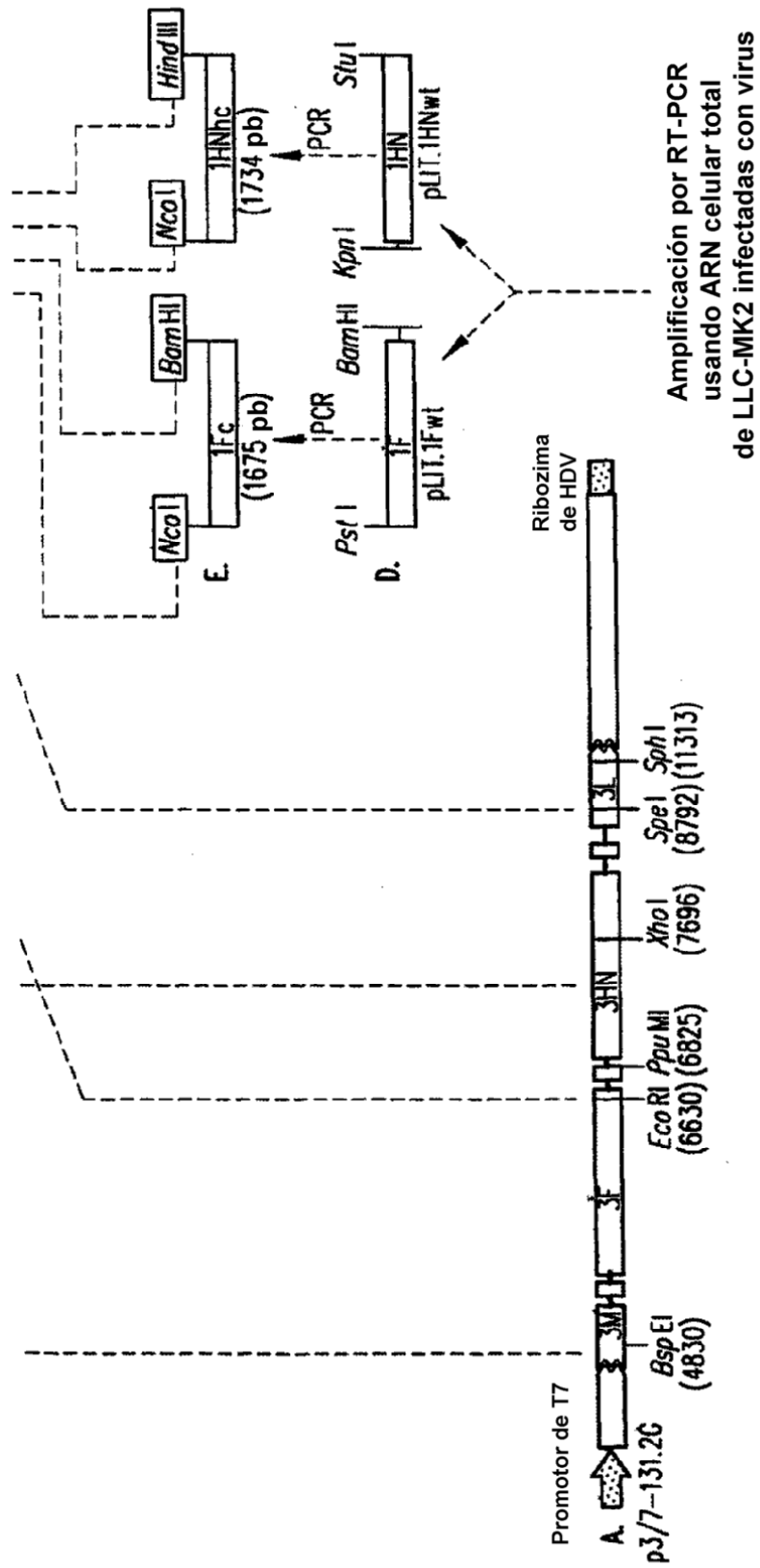


FIG. 14B

FIG. 15B

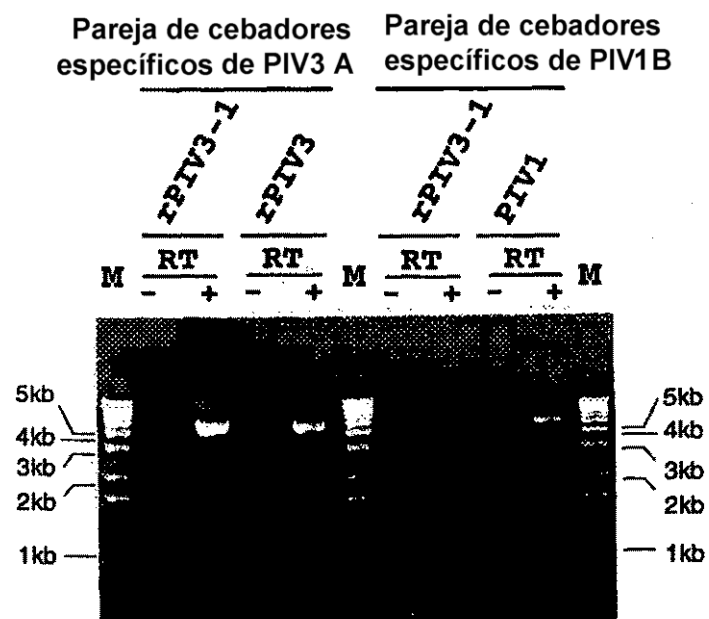


FIG. 16

REGIÓN I			ORF de F
rPIV3	5039	AAGAGACCGGCAACACAAGCACACAAAGCACACAAATGCCAACITCAATACTGCTAAATATTACAACCAATG	5107
rPIV3-1	5039	AAGAGACCGGCAACACAAGCACACAAAGCACACAAATGCCAACITCAATACTGCTAAATATTACAACCAATG	5107
PIV1		AAATTCAATAATAACACCAAGATAGAGACAAATGCCAACITCAATACTGCTAAATATTACAACCAATG	
REGIÓN II			ORF de F
rPIV3	6659	AATGACAAGCCATATGTACTAACAAACAATAACATATCTACAGATCATTAAGATTAATAATTAATAA	6727
rPIV3-1	6707	AGAAATCCCTACATGCGCTAACAACTCCAAATAGCATCCCTACAGATCATTAAGATTAATAATTAATAA	6775
PIV1		AGAAATCCCTACATGCGCTAACAACTCCAAATAGCATCCCTACAGATCATTAAGATTAATAATTAATAA	
REGIÓN III			ORF de HN
rPIV3	6773	AGGAAGGACCCCAATAGACAAAATCCAAATTCGAGATGGAATACTGGAAGCATACCAATCAGGAAAGCAT	6841
rPIV3-1	6821	AGGAAGGACCCCAATAGACAAAATCCAAATTCGAGATGGAATACTGGAAGCATACCAATCAGGAAAGCAT	6877
PIV1		GAGCTCTGGTACCAGCATCCGATTATACAAACGATGGCTGAAAAGGGAAACAAATAGTTCATAATTGG	
REGIÓN IV			ORF de HN
rPIV3	8486	ATGTTGTTCAAAACAGAGATTCCAAAGCTGCAGTTAATCATATAATTAACCAATAATTCATCAATCTA	8554
rPIV3-1	8540	AAGACAAGTATCCCTAAAATATGTAATAATCACAATCTTAAGCTTAAATTAACCAATAATTCATCAATCTA	8608
PIV1		AAGACAAGTATCCCTAAAATATGTAATAATCACAATCTTAAGCTTAAATTAACCAATAATTCATCAATCTA	

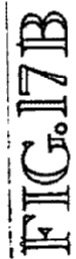


FIG. 18

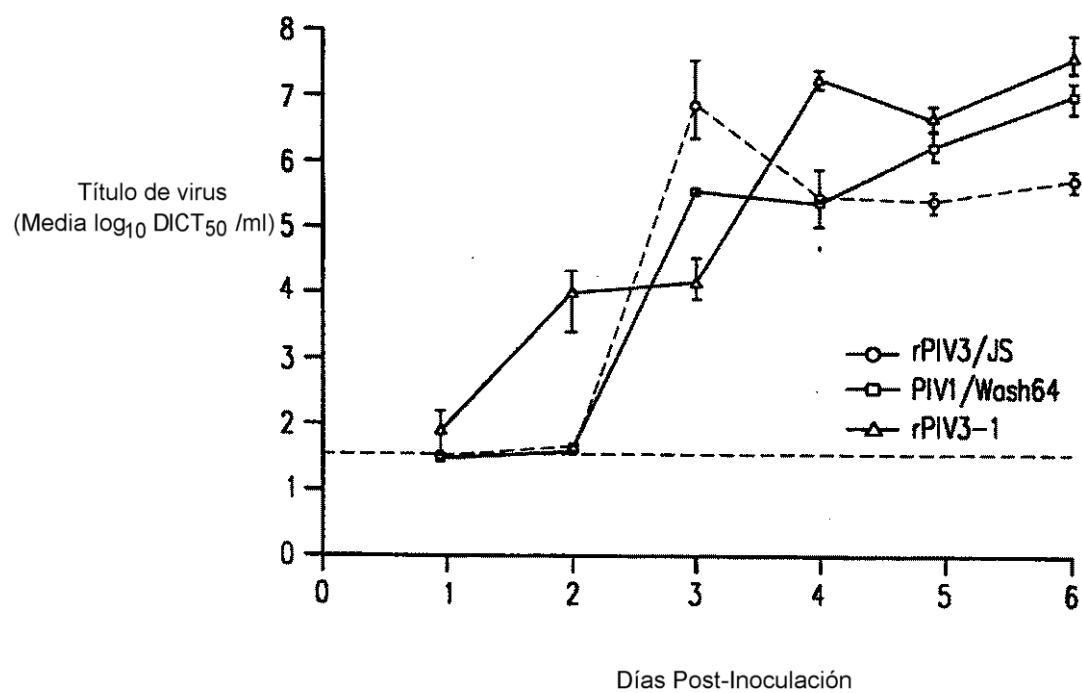


FIG. 19

