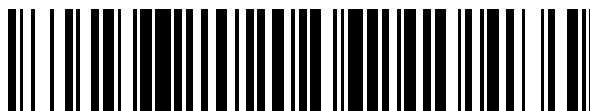


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 523**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00	(2006.01)
C12N 7/04	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
C07K 14/135	(2006.01)
A61K 35/76	(2015.01)
A61K 39/12	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/155	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2004 PCT/NL2004/000911**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2005 WO05061698**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2004 E 04808827 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 1699919**

54 Título: **Virus respiratorio sincitial con una deficiencia genómica complementada in trans**

30 Prioridad:

24.12.2003 WO PCT/NL03/00930

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

**DE STAAT DER NEDERLANDEN,
VERTEGENWOORDIGD DOOR DE MINISTER VAN
VOLKSGEZONDHEID, WELZIJN EN SPORT
(100.0%)
P.O. BOX 20350
2500 EJ DEN HAAG, NL**

72 Inventor/es:

**LUYTJES, WILLEM y
WIDJOJOATMODJO, MYRA, NOORELY**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 618 523 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus respiratorio sincitial con una deficiencia genómica complementada *in trans*

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la vacunación, y más específicamente a vacunas contra una enfermedad provocada por pneumovirus tal como por ejemplo el virus respiratorio sincitial (RSV). La invención se refiere a viriones de RSV que portan un genoma de RSV donde un gen que es esencial para la infectividad ha sido inactivado, mientras que el producto génico de tipo salvaje correspondiente se complementa *in trans* para el virión. La invención se refiere además a métodos para la producción de tales viriones de RSV y a su uso en vacunas y métodos para la vacunación contra pneumovirus.

15 Antecedentes de la invención

[0002] El virus respiratorio sincitial humano se clasifica en el género Pneumovirus, de la familia Paramixovirus. Es una causa importante de enfermedad del tracto respiratorio inferior severa en bebés, personas mayores e individuos inmunocomprometidos. Es también un factor importante en la enfermedad del tracto respiratorio superior en niños mayores y adultos. Actualmente no hay vacuna eficaz para el RSV humano disponible en la técnica.

[0003] El RSV es un virus de ARN envuelto que expresa dos antígenos principales en su superficie: la proteína de fijación G y la proteína de fusión F. Ambas proteínas parecen recurrir a anticuerpos protectores. G es la determinante de los dos subgrupos de RSV humano conocidos A y B. Se pueden encontrar antigénicas en los dos grupos. La proteína G muestra un alto grado de variación con solo 53 % de homología de aminoácidos entre los grupos de A y B y hasta 20% de diferencias en las secuencias de proteína G dentro del grupo A (Mufson 1988, Cane 1991).

[0004] La inmunización pasiva con inmunoglobulina enriquecida con RSV (Respigam) o anticuerpos monoclonales humanizados sintéticos contra F (Palivizumab) se usa actualmente para tratar y proteger a los neonatos de ciertas predisposiciones (por ejemplo, nacimiento prematuro) contra la infección de RSV (Robinson 2000, Greenough 2000). La patología del RSV tiene dos aspectos principales: daño celular provocado por el propio virus y daño de tejido provocado por el sistema inmunológico sobrereactivo. El último es un factor de alta complicación en el diseño de la vacuna.

[0005] Las infecciones con el RSV son estacionales, limitadas al periodo de invierno y tienen su pico máximo en el hemisferio norte alrededor del final del año. El RSV infecta a todos los niños antes de haber cumplido los dos años, en muchos casos dos veces. Los individuos mayores se infectan de media una vez cada dos años, dependiendo del entorno; las personas que están en contacto con bebés y niños pequeños tienen un 50% de riesgo. El virus se propaga por contacto cercano, en gotas o a través de superficies contaminadas. El RSV no se propaga de forma eficaz a través de aerosoles; las partículas del virus son relativamente inestables. La propagación interna del virus desde el tracto respiratorio superior (TRS) al tracto respiratorio inferior (TRI) se produce predominantemente por inhalación de partículas del virus producidas en el epitelio del TRS durante la infección primaria. La propagación a través de la formación de sincitio (una de las propiedades patológicas del virus, que le da su nombre) puede no descartarse y puede desempeñar un papel secundario en la infección del TRI.

[0006] En general, la patología del RSV comienza en el TRS; la puerta de entrada es la nariz y en menor medida los ojos - no la boca. Cuando se restringe a los tejidos del TRS, la enfermedad se limita a un resfriado común, aunque en adultos a veces es grave. Sin embargo, cuando el virus puede alcanzar el TRI, se puede producir bronquiolitis y neumonía en individuos desprotegidos. En niños pequeños, este puede ser mortal, aprox. 1/100 requerirá hospitalización y ventilación mecánica, un 1% puede morir. En personas mayores, la enfermedad del TRI inducida por el RSV es una principal causa de hospitalización; se sospecha que el RSV causa el 25% de las enfermedades tipo gripe.

[0007] La respuesta inmune al RSV es compleja. En general, la exposición al RSV humano desarrollará una respuesta que protege contra la enfermedad del TRI. Esta respuesta disminuye con la edad, provocando una mayor susceptibilidad al RSV de la población de más edad. Una protección de larga duración eficaz contra la enfermedad del TRS parece no factible: la reinfección es muy común incluso en la misma temporada y no es provocada por una variación vírica. La protección contra la infección del RSV implica anticuerpos contra las proteínas virales F y G que circulan en la sangre, lo que puede prevenir la enfermedad del TRI. La infección del TRS se puede controlar por anticuerpos mucosales contra F y G, pero éstos tienen una vida útil limitada. Las células T CD8+ contra proteínas virales desconocidas aún son necesarias para eliminar el virus de tejidos infectados, pero parecen ser de corta duración o ineficazmente reclutadas de sus depósitos. Muy probablemente, esto es causado por factores expresados en el RSV, posiblemente codificados en el gen G (Srikiatkhachorn, 1997a).

[0008] Un aspecto importante de la enfermedad por RSV es la mejora inmune de la patología. En casos limitados, la respuesta inmune celular puede exacerbar la enfermedad de RSV por la acción de citocinas en tejidos infectados

liberados a partir de granulocitos atraídos excesivamente. La predisposición del huésped está implicada en esta reacción, pero posiblemente también el momento de la primera infección por RSV después del nacimiento. Desafortunadamente, los ensayos de vacuna temprana con RSV inactivado con formalina mostraron que en estos ajustes de vacunación prevalecía la patología inmune mejorada contra la infección de tipo salvaje (Kim 1969). Los factores contenidos en el RSV parecen ser los responsables de este fenómeno y aparentemente fueron liberados por tratamiento de formalina. En los 40 años transcurridos desde entonces, se demostró gradualmente que la proteína G viral es el mediador predominante de estos problemas, pero el mecanismo sigue siendo poco claro (Srikiatkachorn 1997b). En cualquier caso, la vacunación con una proteína G fuera del contexto del virión (es decir, en preparaciones de virus inactivadas, como producto de expresión no insertado debidamente en una membrana o en forma de péptidos) parece estar causando la mejora inmune en los sistemas modelo. Así, aunque G contribuye hasta cierto punto a la inmunidad del RSV, sus propiedades también complican el diseño de la vacuna.

[0009] Los candidatos a la vacuna del RSV vivo iniciales incluyeron mutantes transferidos en frío o termosensibles. Los anteriores se han atenuado por el cultivo a temperatura decreciente, dando lugar a dependencia de bajas temperaturas para el crecimiento, mientras que los últimos mutantes se han hecho dependientes de una temperatura específica, normalmente más alta, para la replicación por mutagénesis química o de radiación. Estos candidatos a la vacuna del virus vivo parecieron estar sub- o sobreatenuados (Crowe 1998).

[0010] Los candidatos a la vacuna de subunidad se derivan bien de la proteína F o G del RSV, siendo los objetivos principales para la neutralización de anticuerpos. Una vacuna de subunidad candidata, PFP2, proteína F purificada, es segura en pacientes seropositivos con el RSV, pero no proporcionó protección completa contra la infección del TRI y la enfermedad asociada (Gonzalez 2000). Otro método de vacuna de subunidad es BBG2Na, que consiste de un polipéptido, que comprende los aminoácidos 130-230 de G de RSV humano, fusionados con el dominio de unión a la albúmina de la proteína G de estreptocócica (Power 1997). BBG2Na induce una respuesta de tipo 2 auxiliar T en ratones neonatales, y no suscita inmunopatología de pulmón (Siegrist 1999). No hay datos aún sobre protección. El uso de nuevos adyuvantes para una respuesta inmune humoral y celular equilibrada están en investigación actualmente en modelos animales (Plotnicky 2003).

[0011] El uso de vectores plásmido-ADN que codifican antígenos de F y G de RSV como candidatos de vacuna se ha estudiado en modelos animales. Estas vacunas inducen respuestas protectoras en roedores (Li 2000), pero en un estudio ratones inmunizados con vacuna candidata de ADN F de RSV desarrollaron una respuesta inflamatoria pulmonar ligeramente mejorada tras la exposición al virus de tipo salvaje (Bembridge 2000). La viabilidad del uso de vacunas de ADN plásmido en seres humanos no se conoce aún y probablemente tarde al menos 15 años antes de que el método esté lo suficientemente estudiado y - de manera más importante - aceptado, particularmente para los neonatos. Las vacunas candidatas basadas en sistemas de entrega de vector están formadas por vectores recombinantes vivos que expresan proteínas de RSV. Por ejemplo, el virus vaccinia recombinante que expresa F y G de RSV proporcionó protección en ratones, pero careció de este efecto en chimpancés (Collins 1990). La pregunta es si estos sistemas son seguros (especialmente el virus vaccinia) y factibles a la luz de anticuerpos (maternos) existentes contra los poxvirus en la comunidad y el grupo de objetivo principal son los neonatos.

[0012] Varias vacunas candidatas se basan en RSV vivo recombinante, generado por genética inversa. Una línea de estudio se focaliza en atenuar estos virus por la introducción de mutaciones individuales o combinadas responsables de la adaptación al frío y la termosensibilidad en el virus recombinante. Ninguna de estas vacunas candidata fueron utilizables, debido a su sobre- o sub-atenuación. Otra línea de estudio se centra en la eliminación de uno o más genes no estructurales víricos. Datos limitados están disponibles en el comportamiento de estos virus en los sistemas modelo (Jin 2003).

[0013] Un método alternativo para el desarrollo de vacuna de RSV es el uso de RSV bovino. Un RSV bovino quimérico con la proteína F humana solo o la proteína F y G humana fue evaluado para su eficacia en chimpancés. Esta vacuna candidata fue restringida en la replicación hasta tal grado que los animales no estaban protegidos después de la exposición al RSV humano de tipo salvaje (Buchholtz 2000).

[0014] Así, actualmente no hay vacuna de RSV humano eficaz disponible en la técnica. Todas las vacunas candidatas de RSV que se han evaluado en modelos de animales son inservibles en seres humanos. De este modo, hay una necesidad muy importante en la técnica de vacunas de RSV que sean tanto eficaces como seguras y es un objeto de la presente invención proporcionar tales vacunas.

Descripción de la invención

Definiciones

[0015] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para referirse a que los elementos después del verbo están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad que más de uno del elemento esté presente, a menos que el contexto

especifique claramente que hay uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno".

5 [0016] El término "virión" como se utiliza en este caso se refiere a una partícula viral que contiene la proteína nucleocápsida, el genoma vírico y el complejo de replicasa en un envoltorio de lípidos que contiene las glicoproteínas estructurales víricas.

10 [0017] Los términos "infectividad de un virus", "virus infeccioso", "partícula vírica infecciosa" o "virión infeccioso" denotan virus, partículas víricas o viriones que son capaces de entrar en las células huésped adecuadas e iniciar un ciclo de replicación vírica, independientemente de que lleve a la producción de nuevos virus que sean infecciosos.

Descripción detallada de la invención

15 [0018] En un primer aspecto la presente invención se refiere a un virión de un pneumovirus. El virión comprende un genoma viral que tiene una mutación en un gen que codifica para una proteína que es esencial para la infectividad del pneumovirus, donde la mutación hace que un virus producido a partir de solo el genoma viral carezca de infectividad, y donde el virión comprende la proteína en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión.

20 [0019] El pneumovirus es preferiblemente un virus respiratorio sincitial (RSV), más preferiblemente un RSV humano o bovino. El RSV humano puede bien ser un virus del subgrupo A o B, y es preferiblemente un aislado clínico, más preferiblemente un aislado que no ha sido extensivamente transferido *in vitro* (preferiblemente transferido menos de 10, 8, 6 o 5 veces como se describe en los ejemplos). Por lo tanto, cualquier cepa de RSV o aislado se puede utilizar en el contexto de la presente invención, donde se entiende que la invención solo se ejemplifica mediante el aislado de RSV humano particular 98-25147-X, denominado aislado X de RSV. Además se prefiere que el virus sea un aislado clínico reciente por lo cual reciente se define como habiéndose aislado primero hace menos de 10, 8, 6, 4, 3 o 2 años. Se entiende que aunque las secuencias de nucleótidos en el virión no necesitan corresponderse con las del aislado reciente, preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las proteínas presentes en el virión de la invención son idénticas a las proteínas como se producen en un aislado clínico reciente.

30 [0020] El genoma viral comprende al menos una mutación en al menos un gen viral que codifica para una proteína que es esencial para la infectividad del pneumovirus, donde la infectividad del virus es tal y como se ha definido anteriormente. Así, la proteína que es esencial para la infectividad del pneumovirus es una proteína que es esencial para la capacidad del virión de la invención para introducir una célula huésped adecuada e iniciar un ciclo de replicación viral, por lo cual el ciclo de replicación no lleva necesariamente a la producción de nuevos viriones infecciosos. En viriones preferidos de la invención, la mutación hace que el virión carezca de infectividad *in vivo*, es decir en un organismo huésped adecuado, donde los viriones pueden seguir siendo infecciosos para las células huésped adecuadas cultivadas *in vitro*.

40 [0021] En un virión preferido de la invención, el gen mutado que codifica para una proteína esencial para la infectividad del pneumovirus, es un gen, que codifica para una proteína estructural del virus. Una proteína estructural de un pneumovirus se entiende aquí que es una proteína que está presente en viriones de virus infeccioso de tipo salvaje. Los genes preferidos que codifican para proteínas estructurales que se deben mutar en los viriones de la invención es el gen que codifica para la proteína de fijación G. La eliminación y/o la inactivación funcional del gen que codifica para la proteína G sirve para varios fines y evita un número de problemas y complicaciones de las vacunas candidatas actuales de RSV. Un fin es la seguridad de la vacuna: RSV sin la proteína G es altamente atenuado en su huésped (Karron 1997, Schmidt 2002) porque no será capaz de infectar eficazmente células huésped. Una complicación es que la proteína G está fuertemente implicada en causar respuestas inmunológicas no deseadas, incluyendo patología inmune mejorada (Alwan 1993, Srikiatkachorn 1997b) y posible distorsión del sistema inmune hacia un estado propenso a la alergia (y al asma) bajo determinadas predisposiciones genéticas (Openshaw 2003, Peebles 2003). Esto se evitará por eliminación o inactivación del gen G. Un virión pneumovírico de la invención que comprende un genoma viral que tiene un mutación de inactivación en el gen codificante para una proteína G de fijación, y que comprende la proteína G de fijación en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión se denomina un (pneumo) virus o virión "ΔG +G". De forma similar, el virión que tiene la mutación de inactivación en el gen que codifica para una proteína G de fijación, pero que no está complementado *in trans* con una cantidad funcional de proteína G se denomina un (pneumo)virus o virión "ΔG".

60 [0022] Los viriones pneumovíricos de la invención están por lo tanto reconstituidos transitoriamente y funcionalmente con una proteína codificada externamente que es esencial para la infección. Preferiblemente la proteína codificada externamente que es esencial para la infección es la proteína de fijación G. Preferiblemente la proteína codificada externamente que es esencial para la infección es del mismo subgrupo viral (A o B) que el genoma que está presente en el virión. Más preferiblemente la proteína codificada externamente que es esencial para la infección es homóloga del genoma que está presente en el virión, por lo cual se entiende que la proteína tiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos que fue codificada en el genoma del virus antes de su inactivación. Alternativamente, esto puede significar que la proteína codificada externamente tiene la misma secuencia de aminoácidos que la presente en un virión de tipo salvaje del cual las secuencias de aminoácidos con

una o más proteínas codificadas internamente tiene 100% de identidad con su contraparte en el virión de la invención.

[0023] En los viriones de la invención, la mutación en el gen de la proteína estructural esencial es una mutación que hace que el virus producido a partir de solo el genoma viral carezca de la proteína o exprese una proteína biológicamente inactivada. La producción de virus de solo el genoma viral se entiende que se refiere a virus producidos exclusivamente a partir del genoma viral como presente en los viriones y en ausencia de cualquier secuencia codificante que complementa el genoma viral *in trans*. El genoma viral como presente en los viriones es incapaz así de dirigir la expresión de la proteína estructural esencial. Esto se puede conseguir de varias maneras conocidas por la persona experta, incluyendo, por ejemplo, la inactivación del codón iniciador de la traducción, la introducción de codones de parada cerca del N-término de la proteína codificada, una o más mutaciones de desplazamiento de marco, la eliminación de uno o más fragmentos del gen. Preferiblemente, el gen se inactiva por eliminación de al menos 10, 20, 50, 75, 90 o 95% de la secuencia que codifica para la proteína estructural esencial. Más preferido es, sin embargo, un virión donde la mutación comprende la eliminación de la secuencia (entera) que codifica para la proteína.

[0024] Explícitamente incluidos en la invención están los viriones en los que más de una mutación está presente. En particular, más de un gen de codificación de proteína viral puede comprender mutaciones que inactivan o alteran la función de la proteína en cuestión, o que hacen que la proteína carezca de los viriones como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo las mutaciones transferidas en frío o termosensibles como las conocidas en la técnica se pueden combinar con inactivación de las proteínas estructurales esenciales como se han descrito en la invención anteriormente.

[0025] La clarificación de pneumovirus como los RSV de los organismos huésped infectados requiere inmunidad celular apropiada, que no se montará eficazmente sin la infección de células epiteliales por el virus. Sin embargo, los pneumovirus mutantes de la invención carecen de la información genética para una proteína que es esencial para la infección de células huésped *in vivo*. Por lo tanto, la presente invención divulga métodos para la producción de los pneumovirus mutantes, que incluyen replicación de pneumovirus mutantes en células que complementan (*in trans*) para la ausencia de la proteína que es esencial para la infección.

[0026] En otro aspecto, la invención así se refiere a un método para la producción de los viriones pneumovíricos mutantes definidos anteriormente. El método es un método para producir viriones pneumovíricos, por lo cual los viriones comprenden un genoma viral que tiene una mutación en un gen que codifica para una proteína que es esencial para la infectividad (*in vivo*) del pneumovirus, por lo cual la mutación hace que un virus producido a partir de solo el genoma viral carezca de infectividad, y por lo cual el virión comprende la proteína en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión. El método comprende las etapas de: (a) infección de un cultivo de una primera célula huésped con un pneumovirus que comprende un genoma viral que tiene una mutación tal y como se ha definido anteriormente, por lo cual la célula huésped comprende un vector de expresión que dirige la expresión, bien transitoriamente o constitutivamente, en la célula huésped de la proteína en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión; y, (b) recuperación de los viriones a partir del cultivo de la célula huésped infectada. La recuperación de viriones a partir del cultivo de la célula huésped infectada puede incluir bien o tanto la recuperación a partir del medio de cultivo como la recuperación a partir de las células.

[0027] La primera célula huésped puede ser cualquier célula huésped donde el pneumovirus sea capaz de replicación, con o sin la expresión simultánea *in trans* de la proteína que es necesaria para la infectividad del virión. Células huésped adecuadas para este propósito son por ejemplo los cultivos de células de riñón de mono verde africano (tal como por ejemplo Vero, lote ECACC 10-87, pasaje 134, 1990, aprobado por EMEA).

[0028] En un método preferido de la invención, el pneumovirus que se usa para infectar el cultivo de un primer cultivo de célula huésped, se produce en un método que comprende las etapas de: (a) aportación a una segunda célula huésped de uno o más vectores de expresión que dirijan la expresión en la célula huésped de: (i) un ARN genómico viral que tiene una mutación en un gen que codifica para una proteína que es esencial para la infectividad (*in vivo*) del pneumovirus, por lo cual la mutación hace que un virus producido a partir de solo el genoma viral carezca de infectividad y, (ii) un complejo enzimático de polimerasa pneumovírica y opcionalmente una o más proteínas virales; y, (b) cultivo de la segunda célula huésped por la cual los viriones son producidos. En un método preferido, los viriones producidos por la segunda célula huésped son amplificados por una o más etapas de infección celular que emplean células huésped que son iguales o diferentes de la segunda célula huésped.

[0029] La segunda célula huésped puede ser cualquier célula huésped donde el pneumovirus sea capaz de replicación, con o sin la expresión simultánea *in trans* de la proteína que se requiere para la infectividad del virión. Células huésped adecuadas para este propósito son por ejemplo los cultivos de células de riñón de mono verde africano (tal como por ejemplo Vero, lote ECACC 10-87, pasaje 134, 1990, aprobado por EMEA) o células Hep-2. La segunda célula huésped puede ser igual o diferente de la primera célula huésped.

[0030] En los métodos de la invención, el ARN genómico viral es transcrito a partir de una copia de ADN viral que está bajo el control de un promotor de ARN-polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago y por lo cual la

(segunda) célula huésped está provista de un vector de expresión que dirige la expresión en la célula huésped de la ARN-polimerasa dependiente del ADN de bacteriófago. Preferiblemente, la ARN-polimerasa dependiente del ADN de bacteriófago es una polimerasa T7, T3 o SP6.

5 [0031] El complejo enzimático de polimerasa pneumovírica que es expresado a partir de uno o más vector(es) de expresión en la segunda célula huésped al menos incluye las proteínas L, P, N expresadas a partir de sus genes correspondientes o del ADNc en el vector(es) de expresión. Para eficiencia mejorada de ensamblaje y embalaje viral del ARN genómico viral desnudo, opcionalmente, una o más proteínas virales se expresan en las segundas células huésped. Las proteínas virales preferidas para este propósito incluyen las proteínas de membrana de matriz viral de las cuales la proteína M2-1 es particularmente preferida. Las proteínas L, P, N, M2-1, G o F son preferiblemente derivadas a partir del genoma viral del aislado viral que se introduce y expresa en la célula huésped, pero alternativamente también las proteínas homólogas de otras fuentes virales o no virales heterólogas se pueden utilizar.

10
15 [0032] La persona experta apreciará que una amplia variedad de vectores de expresión y secuencias reguladoras (tales como promotores) están disponibles en la técnica para la expresión del ARN genómico viral, la ARN-polimerasa dependiente del ADN, el complejo enzimático de polimerasa pneumovírica y otras proteínas virales opcionales, al igual que la proteína estructural esencial, en la primera y/o segunda célula huésped (véase, por ejemplo Sambrook y Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

20
25 [0033] Para genética inversa de virus de ARN, es decir expresión de un virus de ARN recombinante tal como los viriones de la presente invención, una copia de ADNc del ARN genómico viral se clona en plásmidos y se coloca bajo el control de secuencias que permitirán la síntesis de ARN a partir de ADN bajo ciertas condiciones. Generalmente, la secuencia promotora para ARN-polimerasa de bacteriófago (por ejemplo la ARN-polimerasa T7) se coloca arriba de la copia de ADN del genoma de ARN, mientras que un terminador apropiado para la ARN-polimerasa se coloca abajo del genoma. Las secuencias de ribozima autoquebrantantes se colocan arriba de las secuencias terminadoras, para permitir la síntesis de ARN con los nucleótidos terminales correctos. Las secuencias terminales correctas son generalmente necesarias para rescatar virus del ARN sintético. Para virus de ARN de cadena negativa no segmentada, la coexpresión del complejo enzimático de polimerasa (proteínas N, P y L para paramixovirus) junto con el ARN genómico o anti-genómico es necesaria para obtener virus recombinante (revisado por Neumann 2002 y ejemplificado en los ejemplos aquí).

35 [0034] Otros métodos preferidos pueden comprender la etapa del aislamiento y/o de purificación de los viriones de la invención y/o la formulación de estos viriones en composiciones farmacéuticas. Métodos para el aislamiento y/o la purificación de viriones son conocidos por los expertos virologistas. Tales métodos incluyen por ejemplo varias técnicas de centrifugación (por ejemplo centrifugación diferencial o de densidad), o técnicas cromatográficas. Un método para la formulación de los viriones de la invención en una composición farmacéutica al menos comprende la etapa de la mezcla de los viriones con un portador farmacéuticamente aceptable tal y como se define por debajo.

40
45 [0035] En otro aspecto la invención se refiere a una composición que comprende un virión tal y como se ha definido anteriormente u obtenible en un método tal y como se ha definido anteriormente, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición es preferiblemente una composición farmacéutica que es preferiblemente adecuada para su uso como una vacuna, es decir la composición es preferiblemente una vacuna.

50 [0036] En otro aspecto, la invención proporciona un producto farmacéutico que comprende como sustancia activa un virión según la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. Estabilizantes, agentes osmóticos, agentes tamponantes, agentes de dispersión, y similares farmacéuticamente aceptables también se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas. La forma preferida depende del modo de administración deseado y uso terapéutico. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para entregar las membranas virales reconstituidas al paciente. Portadores farmacéuticamente aceptables para la entrega intranasal se ejemplifican mediante agua, soluciones salinas tamponadas, glicerina, polisorbato 20, Cremophor EL, y una mezcla acuosa de glicérido caprílico/cáprico, y se pueden tamponar para proporcionar un ambiente de pH neutro.

55 [0037] Para la administración por inhalación, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se entregan convenientemente en forma de un aerosol desde embalajes presurizados o un nebulizador, donde los viriones están presentes en un portador como se ha descrito para la entrega intranasal pero con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar mediante una válvula para entregar una cantidad dosificada.

60
65 [0038] Métodos para la preparación de composiciones intranasales o de inhalador se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980). Los viriones se pueden formular así como el componente activo en cualquier preparación para vacunación, que puede además por ejemplo incluir portadores, adyuvantes, estabilizadores, solubilizantes, conservantes y otros excipientes conocidos en la técnica, para permitir o ayudar a la

administración eficaz de la preparación para la vacunación de individuos, preferiblemente humanos y animales de engorde o de granja (tales como vacas, cerdos, caballos, cabras, ovejas).

5 [0039] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la vacunación contra, o para la profilaxis o terapia (prevención o tratamiento) de una infección pneumovírica por administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de (una composición farmacéutica que comprende) los viriones de la invención tal y como se han definido anteriormente, u obtenible tal y como se ha definido anteriormente, a un sujeto que requiere profilaxis o terapia. Preferiblemente, los viriones se administran por vía intranasal.

10 [0040] La invención de forma similar se refiere a viriones de la invención tal y como se ha definido anteriormente, u obtenibles tal y como se ha definido anteriormente, para su uso como un medicamento, preferiblemente un medicamento para la vacunación contra o para la profilaxis o terapia de una infección pneumovírica. La invención se refiere además al uso de los viriones de la invención en la producción de un medicamento para la vacunación contra o para la profilaxis o terapia de una enfermedad pneumovírica o infección. Preferiblemente el medicamento es una
15 preparación para la administración intranasal.

[0041] Las composiciones que comprenden los viriones de la invención para la vacunación se administran preferiblemente por vía intranasal a los huéspedes apropiados. En una forma de realización, los terneros se deben proteger de infecciones de RSV bovino. En otra forma de realización, los seres humanos, de los cuales
20 preferiblemente bebés y personas mayores o individuos inmunocomprometidos se protegen de infecciones de RSV humano. Las formulaciones preferiblemente comprenden formulaciones adecuadas para la administración como gotas intranasales o spray, preferiblemente un spray nasal. Las partículas $\Delta G+G$ -pneumovirales en la composición infectarán a las células epiteliales del tracto respiratorio superior solo una vez debido a que los viriones de segunda generación producidos a partir de las células epiteliales de TRS infectadas inicialmente carecen de la proteína G de
25 fijación para la que la secuencia codificante ha sido retirada del genoma. Estos ΔG -viriones no son por lo tanto infecciosos *in vivo* en organismos huésped. Sin embargo, el ciclo único inicial de infección permite el desarrollo de inmunidad celular apropiada - que es una respuesta capaz de clarificar la infección del virus de tipo salvaje - para su montaje contra el pneumovirus, o RSV en particular, mientras que los anticuerpos protectores contra F - es decir los anticuerpos que prevendrán la infección del tracto respiratorio inferior - serán obtenidos por la vacuna y la progenie no infecciosa. Los anticuerpos Anti-F son eficaces en la limitación de la infección de RSV, como se muestra por la
30 eficacia del tratamiento con Palivimuzab, que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra F. Esta es la base de la eficacia de las vacunas pneumovíricas atenuadas vivas recombinantes de la invención. Estas vacunas virales vivas resuelven un número de problemas asociados a vacunas candidatas de pneumovirus actuales. La presencia de la proteína G en su contexto natural en el virión permite el desarrollo de inmunidad celular apropiada mientras que los efectos indeseables de la inmunidad contra la proteína G aislada que es en gran medida responsable de la mejora inmune de la patología de RSV bovino y de RSV humano en el ganado bovino y en los seres humanos respectivamente, se evita.

40 Descripción de las figuras

[0042]

45 Figura 1: Diagrama de construcción de pRSVX ΔG . La línea superior representa ARN genómico de aislado X de RSV, con genes indicados. Las cajas por debajo representan productos de RT-PCR y dúplex de oligonucleótidos usados para la construcción. Los números dentro de las cajas indican los números de oligonucleótidos tal y como se enumeran en la tabla I. Los sitios de restricción introducidos para la clonación se indican. El esquema de clonación final se indica por debajo: los círculos son plásmidos y las flechas muestran el orden de clonación.

50 Figura 2. Los alineamientos muestran las diferencias entre secuencias de aislado X de RSV y pRSVX ΔG . Las secuencias se muestran como alineamiento de sentido genómico. Para pRSVX ΔG solo los nucleótidos que difieren de aislado X de RSV son indicados. Secuencias similares se indican por puntos (.) y los espacios se indican por (-). Las señales de inicio de genes están subrayadas con una sola línea, las señales de parada de gen tienen doble subrayado, y los genes se indican en las leyendas. Las cajas perfilan los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción resultantes de los cambios de nucleótidos introducidos.

55 Figura 3. Identificación de marcadores de secuencia en los productos de amplificación RT-PCR de RSV, digeridos de digestiones: a) Mlul, b) Xmal, c) SexA-I, d) SnaB-I.

60 Figura 4. Curvas de crecimiento del aislado X de RSV y aislado X de ΔG -RSV. Células Vero (líneas continuas) y Hep-2 (líneas discontinuas) fueron infectadas con virus a MOI=0,1 e incubadas a 37°C. En los momentos temporales indicados, las células fueron cosechadas y títulos CCID50 fueron determinados en células Vero.

Tabla I. Cebadores usados para clonación por RT-PCR de aislado X de RSV.

65 Tabla II. Cebadores usados para la clonación de plásmidos auxiliares y para plásmidos usados para la construcción de líneas celulares estables.

Tabla III. Cebadores usados para RT-PCR de diagnóstico en el ARN de células Vero infectadas con RSV.

Tabla IV. Resultados de los experimentos de inmunización de ratas de algodón, protección contra la infección con RSV y patología inducida por RSV por inmunización de aislado X de ΔG-RSV.

Ejemplos

[0043] La invención actual se ilustra por los ejemplos no limitativos siguientes que se usan meramente para ilustrar las formas de realización específicas de la invención y no deberían leerse como limitantes del alcance general o de cualquier aspecto de la invención.

Ejemplo 1

Aislado viral, aislamiento, propagación y almacenamiento del virus

[0044] La base para el clon de RSV humano recombinante es un aislado de RSV clínico, obtenido del laboratorio de diagnóstico del *Leiden University Medical Centre*. Este virus, denominado 98-25147-X, codificado del paciente del que se aisló, se derivó de una prueba diagnóstica en células Hep-2 en el periodo del 21-24 de diciembre de 1998. Más tarde se determinó que era un aislado de subtipo A y se designó aislado X de RSV. El virus fue transferido 4 veces en células Hep-2 en frascos T75 en DMEM (Gibco), 10% FCS, pen/estrep/glu y posteriormente cinco veces en células Vero en frascos T75 en DMEM (Gibco), 10% FCS, pen/estrep/glu. El virus de aislado X de RSV resultante fue usado como material de trabajo y almacenado a -13500C en 25% o 45% de sacarosa.

Ejemplo 2

Construcción de ADNc de RSV-X que codifica genoma viral

[0045] ARN total se obtuvo por extracción de isotiocianato de fenol-guanidina (Trizol; Invitrogen) de células Vero infectadas con aislado X de RSV del caldo. ADNc se preparó por transcripción inversa usando transcriptasa inversa de ThermoScript (Invitrogen) usando cebadores de hexámero aleatorios. Este ADNc fue usado como modelo para PCR usando Taq polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen) usando cebadores específicos que contenían sitios de reconocimiento de enzima de restricción (Tabla I y listado de secuencias). Los cebadores fueron diseñados basados en las secuencias publicadas de RSV-A2 (número de acceso del Genbank M74568) y RSV-RSS2 (número de acceso del Genbank U39662).

[0046] Los productos de PCR se clonaron primero individualmente en vectores diferentes: pares de cebador, vectores, sitios de reconocimiento de enzima de restricción y el nombre de vector resultante se enumeran a continuación.

- RSV021/RSV047: vector pCAP (Roche), claramente en Mlu N1, pCAP3 (región SH/M/P)
- RSV018/019: vector pCAP, claramente en Mlu N1, pCAP2 (región G)
- RSV016/RSV017: PUC21, Mlu I /Bam HI, pUK5 (M2-2/M2-1/región F)
- RSV024/RSV025a: PUC21, Bam HI/Afl II, pUK1 (región NS2/NS1)
- RSV022/ RSV023: PUC21, EcoR V, pUK4 (región N)
- RSV014/ RSV015: PUC21, Kpn I/Mlu I, pUK2 (región L)

[0047] Al menos dos clones individuales derivados de dos modelos de ADNc independiente fueron secuenciados; las regiones que contenían diferencias entre los dos clones fueron secuenciadas en un tercer clon. Si fue necesario, los clones se repararon utilizando técnicas de biología molecular estándar conocidas por la persona experta. Los productos de PCR adicionales que cubrían los sitios de unión de los cebadores usados para la clonación fueron obtenidos y secuenciados. Los terminales genómicos 5' fueron determinados por poli-adenilación de ARN genómico, seguido de RT-PCR con un oligo(d)T que contenía cebador ALG018:

TTAAAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

y un cebador de gen NS1 RSV 126:

AATTCTGCAGGCCCATCTCTAACCAAAGGAGT.

[0048] Este fragmento fue clonado en pUC21 usando Hind III/Pst I. El extremo 3' fue determinado por PCR de ligación RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc). Todas las secuencias fueron ensambladas para producir la secuencia de consenso RSV-X (SEC ID N.º: 1).

[0049] Todas las secuencias fueron confirmadas por secuenciación de ciclo de PCR utilizando el equipo terminador BigDye (Applied Biosystems) y analizadas por un analizador genético ABI Prism 310.

Ejemplo 3**Construcción de plásmido de longitud total de aislado X de Δ G-RSV**

[0050] El ADNc en toda su longitud que abarca el genoma del aislado X de RSV entero fue ensamblado por ligamiento secuencial de fragmentos de la PCR (figura 1). El extremo "remolque" está precedido por el promotor para la polimerasa de bacteriófago T7. Para generar los extremos 3' correctos, el extremo "líder" de ADNc se fusiona con la ribozima del virus de hepatitis delta (HDVR), seguido de un terminador de la transcripción de ARN-polimerasa T7 (véase figura 1).

[0051] Primero, se fosforilaron dos conjuntos de oligómeros complementarios que codifican los oligonucleótidos RSV026/RSV027 y los oligonucleótidos RSV028/029 de HDVR y de terminador T7 con ADN quinasa T4, hibridados y ligados en el clon pUK1 (que contiene genes NS1/NS2) vía Rsr II /Not I, dando el plásmido pUK3. Luego, el fragmento Xma I/SexA I del clon pUK4 que contiene N fue ligado en el plásmido pUK3 vía Xma I/SexA I. Este plásmido (pUK6) contiene la región del gen N hasta la secuencia líder 3', fusionada a la HDVR y a un terminador T7.

[0052] En segundo lugar, el fragmento Xma I/Eco RV del plásmido pCAP3 fue insertado en el plásmido pUK5 usando Xma I y un sitio Hind III relleno. Este produce el plásmido pUK8. Posteriormente, pUK 8 fue digerido con BssH II y BsiW I, los extremos se rellenaron con polimerasa de Klenow y religados. Este plásmido contiene los genes M2-2, M2-1, F, SH, M y P y se denomina pUK9.

[0053] Para sintetizar un vector de número de copias bajo para el ADNc del aislado X de RSV, dos oligómeros complementarios, RSV011:

AGCTTGCGGCCGCGTCGACCCGGGACGCGTCGATCGGGTACCAT y RSV012:
CGATGGTACCCGATCGACGCGTCCCGGGTTCGACGCGGCCGCA fueron fosforiladas con ADN quinasa T4, hibridados e insertados en la fosfatasa alcalina tratada y Cla I /Hind III digirió el plásmido pACYC184 (New England Biolabs). El plásmido resultante se denomina pACiC184-MCS. Posteriormente un fragmento de Mlu I-Knp I de pUK2 que contiene el promotor T7 y el gen L fue insertado, este plásmido intermedio se denomina pACYC1. Luego, la región desde el gen N hasta el la secuencia líder 3', incluyendo la secuencia de HDVR y terminador T7 fusionada de pUK6 se añadió a pACYC1 usando Xma I/Not I. Esto da el plásmido intermedio pACYC2. Finalmente, el fragmento Xma I /Mlu I de pUK9 con los genes M2-2, M2-1, F, SH, M y P fue insertado en pACYC2, dando el plásmido pACYC3, que comprende el genoma de RSV entero de la cepa X carente del gen G. El análisis de secuencias del último plásmido reveló una eliminación en la región HDVR, que fue reparada y el plásmido resultante se denominó pRSVX Δ G.

[0054] Además del constructo pRSVX Δ G, el constructo pACYC24 fue generado donde el inserto del aislado X de RSV genómico se complementa de forma inversa mediante PCR inversa. A partir del constructo, el ARN de RSV antígeno se puede sintetizar. En pACYC24, el promotor T7 precede a la secuencia 3'-líder, mientras que la HDVR y T7 terminador se fusionan en la secuencia 5'-remolque.

[0055] Todos los sitios de reconocimiento de enzima de restricción usados para construir pRSVX Δ G están localizados dentro de las regiones intergénicas de RSV y no alteran las secuencias codificantes o afectan a las señales de transcripción (como se muestra en la figura 2).

Ejemplo 4**Construcción de plásmidos auxiliares**

[0056] Los plásmidos auxiliares que expresan diferentes proteínas de RSV fueron construidos de la siguiente manera. Todos los genes necesarios se derivaron de la cepa de laboratorio RSV-A2 (ATCC #VR1302). El virus fue purificado en placa sobre células Hep-2 y posteriormente usado para infectar células Vero. El ARN total fue aislado de estas células por extracción de isotiocianato de fenol-guanidina (Trizol, Invitrogen) y sometido a RT-PCR usando Taq polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen) y un conjunto de cebadores específicos para genes de RSV L, P, N y M2-1 respectivamente (véase tabla II). Los productos de PCR fueron posteriormente clonados en plásmidos de expresión pcDNA3, pcDNA6 o pCI, usando los sitios de reconocimiento de enzima de restricción como se indica en la tabla II. Las secuencias de clon fueron confirmadas por secuenciación de ciclo de PCR utilizando el equipo terminador BigDye (Applied Biosystems) y analizadas por un analizador genético ABI Prism 310.

Ejemplo 5**Construcción de líneas celulares Vero productoras de G**

[0057] Las líneas celulares que producen proteína G de RSV fueron construidas utilizando diferentes métodos:

En el método 1, el gen G de bien el aislado X de RSV-A2 o RSV, o el gen G de RSV-A2, donde el codón de iniciación de la traducción interna ha sido inhabilitado por modificación usando los cebadores RSV033 y RSV034, fueron clonados en el vector de expresión pcDNA3 o pcDNA6 (Invitrogen) usando RT-PCR en el ARN de células Vero infectadas con aislado X de RSV-A2 o de RSV usando cebadores como se indica en la tabla II. Los plásmidos fueron introducidos en células Vero usando agentes químicos CaCl_2 , coprecipitación, liposomas o electroporación (Ausubel 1989). Dos métodos para aislar las líneas celulares estables se usaron. En el primer método, 72 horas después de la transfección, las células se dividieron usando varias diluciones en el medio fresco que contenían medio selectivo, zeocina para pcDNA3 y blasticidina para pcDNA6. Las células fueron alimentadas con medio selectivo cada 3-4 días hasta que los focos celulares fueron identificados. Las colonias individuales fueron escogidas y transferidas a placas de 96 pocillos, o sembradas en varias diluciones para obtener células únicas en una placa de 96 pocillos. Las colonias resistentes a los antibióticos fueron evaluadas en la expresión de G de RSV por técnicas de inmunocoloración o FACS usando anticuerpos específicos de G de RSV. Las colonias que expresan G fueron transferidas, y fueron designadas como líneas celulares estables que expresan G. El segundo método comprende la selección de FACS usando anticuerpos específicos de G de RSV 72 horas después de la transfección. Las células que expresan G de RSV fueron sembradas en una dilución en serie para obtener células únicas en una placa de 96 pocillos y cultivadas con medio selectivo. Las colonias de célula única fueron transferidas en el medio selectivo y evaluadas posteriormente nuevamente para la expresión de G de RSV, dando como resultado la expresión de las líneas celulares G de RSV. En el método 2, el sistema Flp-In (Invitrogen) se utiliza para producir células Vero con sitios de inserción de gen objetivo en posiciones cromosómicas que permiten niveles diferentes de expresión del gen objetivo. El gen G de RSV, derivado de los plásmidos del método 1 pero con una modificación (introducido usando el cebador RSV151: Tabla II) del codón de iniciación de la traducción de G que rodea la secuencia para permitir niveles de traducción más altos, se insertó en cada una de estas líneas celulares utilizando el método genérico de sistema, dando como resultado líneas celulares Vero que expresan de forma estable niveles diferentes de proteína G. En el método 3, las células Vero se hicieron transitoriamente para expresar la proteína G, bien por transfección con los plásmidos de expresión que contenían el gen G gen del método 1, o por infección con el virus vaccinia modificado Ankara (MVA) (Sutter 1992) o los virus fowlpox (Spehner 1990) que expresan la proteína G.

30 Ejemplo 6

Construcción de polimerasa T7 de bacteriófago produciendo líneas celulares

[0058] El gen de polimerasa T7 de bacteriófago se amplifica por PCR a partir del plásmido pPRT7 (van Gennip 1997), conteniendo el gen, usando cebadores ALG022 y ALG023 (Tabla II). El producto de PCR se clona en el vector pcDNA6b, usando Hind III/Xba I, dando el plásmido pc6T7pol. Las células Vero fueron transfectadas utilizando Lipofectamine 2000 según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). 72 Horas después de la transfección las células fueron divididas y se cultivaron en medio fresco que contenía blasticidina. Las células fueron alimentadas con medio fresco cada 3-4 días y se dividieron dos veces para obtener volúmenes de cultivo mayores. 20 días después de la transfección, las células resistentes a la blasticidina fueron transfectadas con plásmido indicador pT7-IRES2-EGFP utilizando Lipofectamine 2000. Para la construcción del plásmido pT7-IRES2-EGFP, el primer plásmido pT7-EGFP fue construido por inserción vía HindIII/BamH1 en el plásmido p-EGFP-N1 (Clontech) de un conjunto de oligómeros complementarios que codifican para la secuencia promotora T7 (ALG32: AGCTAATACGACTCACTATAGGGAGACGCGT y ALG33: GATCACGCGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATT). El plásmido pT7-IRES2-EGFP fue luego construido mediante clonación del fragmento T7-EGFP del plásmido pT7-EGFP en el plásmido p-IRES2-EGFP vía Xma1-Not1. Las células que expresan EGFP fueron clasificadas por FACS y cultivadas en dilución limitada para obtener colonias de célula única. Colonias individuales que expresan ARN-polimerasa T7 fueron evaluadas para estabilidad, cultivadas a mayores volúmenes de cultivo y almacenadas.

50 Ejemplo 7

Método para producir virus de aislado X de ΔG-RSV recombinante

[0059] Células Hep-2 fueron cultivadas en DMEM + 10% FCS (suero de ternero fetal) + penicilina / estreptomina / glutamina, mientras que células Vero y derivados de las mismas se cultivaron en M199 + 5% FCS + pen/estrep/glu. Las células se cultivaron durante toda la noche a 80% de confluencia en platos de 10 mm^2 a 37°C. Para células Vero y Hep-2, las células fueron infectadas con virus modificado Ankara-T7 (MVA-T7)(Sutter 1992, Wyatt 1995) o virus fowlpox-T7 (Britton 1996) en MOI = 3 (multiplicidad de infección 3) e incubadas a 32°C durante 60 min antes de la transfección, para permitir la expresión de polimerasa T7 de bacteriófago. Las células (células Hep-2, Vero o Vero-T7) fueron lavadas con medio de Optimem (Optimem 1 con glutamax, Invitrogen) y posteriormente transfectadas con plásmidos auxiliares que codifican los genes N, P, L y M2.1 de RSV y con plásmido pRSVXΔG, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en OPTIMEM (volumen total 500 μl). Las cantidades siguientes de plásmidos fueron adicionadas: 1,6 μg pRSVXΔG, 1,6 μg pcDNA6-A2-N, 1,2 μg pcDNA3-P, 0,4 μg pcDNA6-A2-L, 0,8 μg pcDNA6-A2-M2.1. Después de 3-4 horas de incubación a 320C, 500 μl de medio Optimem con 2% de FCS fue añadido y las células fueron incubadas a 32°C durante 3 días. Las células se rasparon entonces y la mezcla de células raspadas y el medio que contenía el virus rescatado se usó para infectar cultivos frescos de células Vero o Hep-2 cultivadas

en DMEM + 2% FCS + pen/estrep/glu. El último procedimiento se repitió 4-5 veces para obtener caldos de virus de título elevado.

5 [0060] La identidad del virus del aislado X de Δ G-RSV fue confirmada por RT-PCR en el ARN aislado de células Vero infectadas con aislado X de Δ G-RSV y digestión de los productos obtenidos con las enzimas de restricción únicas cuyo sitios de reconocimiento fueron introducidos en pRSV Δ G (figura 2). Aislado X de RSV fue usado como control.

10 [0061] Para la identificación de marcadores de secuencia en el RSV, células Vero fueron infectadas con aislado X de RSV o con aislado X de Δ G-RSV con un MOI= 0,1. 72 horas después de la infección, ARN de sobrenadantes de cultivo fue aislado y usado como modelo para RT-PCR. Se diseñaron cebadores para flanquear los marcadores de secuencia insertados en el virus de aislado X de Δ G-RSV recombinante. Después de RT-PCR, los productos obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción apropiadas. Los siguientes productos de digestión fueron obtenidos (figura 3):

- 15 a) PCR con cebador RSV065 (GTCCATTGTTGGATTTAATC) y RSV093 (CAAGATAAGAGTGTACAATACTGTC) y digestión con Mlu-I dio los fragmentos previstos de 937 pb para aislado X de RSV, y 459 y 478 pb para aislado X de Δ G-RSV
- 20 b) PCR con cebadores RSV105 (GTTGGATTGAGAGACTT) y RSV113 (AGTATTAGGCAATGCTGC) seguido de digestión con Xma-I dio los fragmentos previstos de 880 pb para aislado X de RSV, y 656 y 224 pb para aislado X de Δ G-RSV
- 25 c) PCR con cebadores RSV112 (CCCAGTGAATTTATGATTAG) y RSV160 (AATTGGATCCATGGACACAACCCACAATGA) y digestión con SexA-I dio los fragmentos previstos de 694 pb para aislado X de RSV, y 492 y 202 pb para aislado X de Δ G-RSV
- d) PCR con cebadores RSV098 (TGGTAGTTCTCTTCTGGCTCG) y RSV114 (ATCCCAAGTCATTGTTCA) seguido de digestión con SnaB-I dio los fragmentos previstos de 1820 pb para aislado X de RSV, y 507 y 387 pb para aislado X de Δ G-RSV.

30 [0062] Las características de crecimiento de aislado X de Δ G-RSV en comparación con aislado X de RSV se determinaron en las células Vero y en Hep-2 (figura 4).

Tabla III. Cebadores usados para RT-PCR de diagnóstico en el ARN de células Vero infectadas con RSV.

Nombre de cebador	Secuencia
RSV065	GTCCATTGTTGGATTTAATC
RSV093	CAAGATAAGAGTGTACAATACTGTC
RSV098	TGGTAGTTCTCTTCTGGCTCG
RSV105	GTTGGATTGAGAGACTT
RSV112	CCCAGTGAATTTATGATTAG
RSV113	AGTATTAGGCAATGCTGC
RSV114	ATCCCAAGTCATTGTTCA
RSV160	AATTGGATCCATGGACACAACCCACAATGA

35 Ejemplo 8

Método para producir virus de aislado X de Δ G+G-RSV recombinante

40 [0063] Virus de aislado X de Δ G-RSV, derivado de células Vero transfectadas, se transfirió varias veces para obtener títulos de al menos 105 pfu/ml (unidades de formación de placas por ml). Diferentes MOI de este virus se usaron luego para infectar la línea de células Vero que produce la proteína G de RSV. El aislado X de Δ G+G-RSV resultante fue cosechado del medio y/o de las células y analizado para la presencia de la proteína G en los viriones por técnicas de inmunodetección. Títulos de infectividad fueron determinados en las células Vero o Hep-2, y la integridad del genoma Δ G fue determinada utilizando RT-PCR en el ARN de virus extraído de células infectadas con virus de aislado X de Δ G+G-RSV. El virus fue almacenado a -1350 C en 25% o 40% de sacarosa.

Ejemplo 9

50 Método para proteger en un modelo animal de rata de algodón contra la infección de RSV y patología inducida por el RSV por inmunización de aislado X de Δ G-RSV

[0064] Se realizaron experimentos de protección en ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*, de 5-6 semanas, 4-6 animales por grupo y ambos sexos). En experimentos iniciales, se demostró que este animal era sensible a la

infección con el RSV y que exhibía una patología de pulmón mediada por vacuna grave como se describe en Prince, 2001 y que imita de cerca la situación humana. Después de la aplicación intranasal del RSV, la patología de pulmón se caracterizó por inflamación infiltrada en y alrededor de los bronquios/bronquiolos e hiperplasia de epitelio. Se vio una patología más grave tras inmunización intramuscular con RSV-A2 inactivado con formalina seguida de una exposición intranasal con RSV-A2. Además de la patología anteriormente mencionada, se observó infiltrado perivascular y peribronquiolar y alveolitis, característico de una patología inmunomediada. Estas observaciones se usaron como referencia "interna" para todos los experimentos de inmunización y de exposición. La infección e inmunización de ratas algodóneras con preparaciones de RSV se hizo por vía intranasal, en ambos orificios de la nariz. Los pulmones de las ratas de algodón fueron examinados para patología con luz microscópicamente y títulos de virus en diferentes momentos a post-exposición o post-infección/inmunización se determinaron en células Vero usando diluciones en serie de homogenizados de pulmón con ELISA específica de RSV para producir títulos CCID50 e inmunocoloración usando abs específico de RSV para producir títulos pfu. Después de la inmunización dos veces con aislado X de ΔG-REV, las ratas de algodón estaban completamente protegidas contra la infección y la patología provocada por el aislado X de RSV en los pulmones. Los resultados de diferentes experimentos se resumen en la tabla IV.

Tabla IV:

		<i>infección con:</i>		t^1	V^2	<i>patología de pulmón</i>		t^3
						<i>pulmón</i>		
						<i>día 5 post infección</i>		
		ΔG-RSV		5	100	sí, moderado		debajo
		aislado X						detección
		RSV-A2		5	100	sí, fuerte		2*5
		aislado X de RSV		5	100	sí, fuerte		4*5
<i>inmunización</i>	t^1	V^2	<i>exposición</i>	t^1	V^2	<i>patología de pulmón</i>		t^3
<i>día 0 y 21</i>			<i>día 42</i>			<i>día 5 post exposición</i>		
2x ΔG-RSV	5	100	aislado X de RSV	5	100	no		debajo
								detección
simulado	100	aislado X de RSV		5	100	sí, fuerte		5
¹ : títulos de virus en registros pfu/ml ² : volumen en μl por animal, que es la mitad de este volumen en cada orificio de la nariz ³ : títulos de virus en registros por gramo de pulmón, límite de detección es 10 ² CCID50								

20 Referencias

[0065]

25 Alwan WH, Record FM, Openshaw PJ. Phenotypic and functional characterisation of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. J Immunol. 1993, 150(12):5211-8.

F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1997.

30 Bembridge GP, Rodríguez N, Garcia-Beato R, Nicolson C, Melero JA, Taylor G. DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. J Gen Virol. 2000, 81 (Pt 10):2519-23.

35 Britton P, Green P, Kottier S, Mawditt KL, Penzes Z, Cavanagh D, Skinner MA. Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. J Gen Virol. 1996, 77 (Pt 5):963-7.

40 Buchholz UJ, Granzow H, Schuldt K, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL. Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. J Virol. 2000, 74(3):1187-99.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. J Gen Virol. 1991, 72(Pt9):2091-6.

- Collins PL, Purcell RH, London WT, Lawrence LA, Chanock RM, Murphy BR. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. 1990, 8(2):164-8.
- 5 Crowe JE Jr. Immune responses of infants to infection with respiratory viruses and live attenuated respiratory virus candidate vaccines. *Vaccine*. 1998, 16(14-15):1423-32. Review.
- Gonzalez IM, Karron RA, Eichelberger M, Walsh EE, Delagarza VW, Bennett R, Chanock RM, Murphy BR, Clements-Mann ML, Falsey AR. Evaluation of the live attenuated cpts 248/404 RSV vaccine in combination with a subunit RSV vaccine (PFP-2) in healthy young and older adults. *Vaccine*. 2000, 18(17):1763-72.
- 10 Greenough A, Thomas M. Respiratory syncytial virus prevention: past and present strategies. *Expert Opin Pharmacother*. 2000, 1(6):1195-201.
- 15 Jin H, Cheng X, Traina-Dorge VL, Park HJ, Zhou H, Soike K, Kemble G. Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*. 2003, 21 (25-26):3647-52.
- Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR, Sidhu MS. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterisation of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94(25):13961-6.
- 20 Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969, 89(4):422-34.
- 25 Li X, Sambhara S, Li CX, Ewasyshyn M, Parrington M, Caterini J, James O, Cates G, Du RP, Klein M. Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med*. 1998, 188(4):681-8.
- 30 Lofland JH, O'Connor JP, Chatterton ML, Moxey ED, Paddock LE, Nash DB, Desai SA. Palivizumab for respiratory syncytial virus prophylaxis in high-risk infants: a cost-effectiveness analysis. *Clin Ther*. 2000, 22(11):1357-69.
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis*. 1988, 157(1):143-8.
- 35 Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol*. 2002, 83(Pt 11):2635-62. Review.
- Openshaw PJ, Dean GS, Culley FJ. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis J*. 2003, 22(2 Suppl):S58-64; discussion S64-5. Review.
- 40 Peebles RS Jr, Hashimoto K, Graham BS. The complex relationship between respiratory syncytial virus and allergy in lung disease. *Viral Immunol*. 2003;16(1):25-34. Review.
- 45 Plotnicky H, Siegrist CA, Aubry JP, Bonnefoy JY, Corvaia N, Nguyen TN, Power UF. Enhanced pulmonary immunopathology following neonatal priming with formalin-inactivated respiratory syncytial virus but not with the BBG2NA vaccine candidate. *Vaccine*. 2003, 21(19-20):2651-60.
- 50 Power UF, Plotnicky-Gilquin H, Huss T, Robert A, Trudel M, Stahl S, Uhlen M, Nguyen TN, Binz H. Induction of protective immunity in rodents by vaccination with a prokaryotically expressed recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment. *Virology*. 1997, 230(2):155-66.
- Prince GA, Curtis SJ, Yim KC, Porter DD. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. *J Gen Virol*. 2001, 82:2881-8.
- 55 Robinson RF, Nahata MC. Respiratory syncytial virus (RSV) immune globulin and palivizumab for prevention of RSV infection. *Am J Health Syst Pharm*. 2000, 57(3):259-64. Review. Erratum in: *Am J Health Syst Pharm* 2000 Apr 1;57(7):699.
- 60 Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Schmidt U, Beyer J, Polster U, Gershwin LJ, Buchholz UJ. Mucosal immunization with live recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and recombinant BRSV lacking the envelope glycoprotein G protects against challenge with wild-type BRSV. *J Virol*. 2002, 76(23):12355-9.
- 65

Siegrist CA, Plotnicky-Gilquin H, Cordova M, Berney M, Bonnefoy JY, Nguyen TN, Lambert PH, Power UF. Protective efficacy against respiratory syncytial virus following murine neonatal immunization with BBG2Na vaccine: influence of adjuvants and maternal antibodies. *J Infect Dis.* 1999, 179(6):1326-33.

5 Spehner D, Drillien R, Lecocq JP. Construction of fowlpox virus vectors with intergenic insertions: expression of the beta-galactosidase gene and the measles virus fusion gene. *J Virol.* 1990, 64(2):527-33.

10 Srikiatkachorn A, Braciale TJ. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med.* 1997a, 186(3):421-32.

Srikiatkachorn A, Braciale TJ. Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 1997b, 71(1):678-85.

15 Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89(22):10847-51.

20 Van Gennip HG, van Rijn PA, Widjojoatmodjo MN, Moormann RJ. Recovery of infectious classical swine fever virus (CSFV) from full-length genomic cDNA clones by a swine kidney cell line expressing bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Virol Methods.* 1999, 78(1-2):117-28.

Wyatt LS, Moss B, Rozenblatt S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology.* 1995, 210(1):202-5.

25 Listado de secuencias

[0066]

30 <110> NVI Nederlands Vaccin Instituut
 <120> Virus respiratorio sincitial con una deficiencia genómica complementada en
 Trans
 <130> P210823 pct
 <160> 33
 <170> PatentIn version 3.1
 35 <210> 1
 <211> 15213
 <212> DNA
 <213> Human respiratory syncytial virus
 40 <400> 1

```

acgagaaaaa aagtgtcaaa aactaatatc tcgtagttta gttaatatac atataaacca      60
attagatttg ggtttaaatt tattcctcct agatcaaaaat gataatttta ggattagttc      120
actagaagtt attaaaaatt atataattat taattttaaa taactataat tgaatacagt      180
gttagtgtgt agccatggga atttttatta taagattttt gttcattatt cattatggaa      240
gttgataaac aaactacctg tgattttaat cagtttttta agttcattgg ttgtcaagct      300
  
```

ES 2 618 523 T3

gtttaacaat tcacttagat gaggatatgt agattctacc atatataaat gattatagtt 360
 taattctggt gatctgaaat ttaaaacatg attgaaccac ttaagatgt tcatgtgctt 420
 atgatttata agtttattgc tgaaaacttc attacgtcca gctatagaat aagatagtat 480
 atctccacta acaaacctct ttagtttaga caatgcagta ttaattcctt tttttggtat 540
 agggaacaa agaaagggt tcaaactctt aatatttgca tcaatagact ctttatcagc 600
 cttcttaggc atgatgaaat ttttggttct tgatagtatc aatttagcat tttgtactac 660
 attaaatact gggaacacat ttgcaggacc tattgtaagg actaagtaa cttcagatcc 720
 ctttaactta ctgcctaagc atacataagt ttttaataata gttatgttgt ctaatttgaa 780
 atcgatatca tcttgagcat gatattttac tattaacgta catttattaa ctgaagaaca 840
 gtacttgcat tttcttacat gcttgctcca ctctattata attttattcc agttgactgt 900
 tacaggcaat tcagcatcac agacaaaaag gctgataggt tcagcaaact ttatatgtaa 960
 ataagaccaa tgaatgttgt tggttgcatc tgtagcagga atggtcaaat tttcaccata 1020
 atcaatgttg atatgtccat tgtacagcct taaaaactca attggtaaac tatgatcatt 1080
 acaatctttc agacttctgt aaatatactt tatatcagga tgaagttcca ctactgtacg 1140
 caataataaa ttccctgctc cttcacctat gaatgctata caattaggat ctttaatttt 1200
 aaggcttttt aaaatatact ctataactaat ttacaacct gtagaactaa atacaaaatt 1260
 gaatctatta atatgatgcc aaggaagcat gcaataaagt gatgtgctat tgtgtactaa 1320
 agatatttga tgagaagtag tagtgtaaag ttggtttagat ttggctgtat tacctgaatg 1380
 atctataatt ttatcaatca caaccgtagg aaataaatta tacaatctt gtctgctgta 1440
 attggttcta atcattgtag acgatttaat aagcttctta ttagataaca atggtaacat 1500
 tattgagtca acatttttac ctatacaata gtcattcagt gtctttttat cttacttttt 1560
 aaccggattg gttagtatat tttctagggt ttctgggtgta ggatgatata atttgttgta 1620
 attactttct aattcagaat tagcaatcct tatatgttta gttaatagat gagtattatc 1680
 tgagaagtta taattaatgt aaaaaagatt agaagtataa aattcatcat tgaatttgtg 1740
 tttattttta atgtatattc tatctatatt tatcaatccc attctaaca gatctatata 1800
 agttaatatt gctttcatat gtggttgatg ataactatg ttaacaacc aagggaac 1860
 tgtgaattct gctacattaa gacgtttaag aaaccatagt ttgaagctat gacatccttt 1920
 tactctatgt aaacttgcat cctggctaag aatgtatttg ataacttttt gttctaaaaa 1980
 taccttagac atagacttcc aataactact gtctattaat tccaatacac ataggagatc 2040
 tgaagtattc atatcacact ccagctttgc tctgctgtaa ctttatgaa aacacaagag 2100
 atatgtctta taagcattga agaaaacttt caaattaatg aacatatgat cagttatata 2160
 tccctctccc caatcttttt caaaaatacc tttagaatct ttcataagtt gtataatcag 2220
 aatccaatgt ccagctaaat tagtacttaa aatgtaagta ttatgaaaat agtcagatat 2280
 cttatgccc aatattaaat tagaattaac attagatcca gatttttagtg ttttattact 2340

ES 2 618 523 T3

taagaataat tccacatatt gagtcaaact tttttgtct ggtaaaaaca tatgctgttt 2400
 ttgtatcact tgttttaact tgtgaatata aacatcacct gtgaatatgg gaggtttcat 2460
 caaatgtata tcattaagct tgggtatgag aataattctg ttaggacata cattagtaaa 2520
 ttgttctact actgacatta agctaaggcc aaagcttata cagttttgga atactatatac 2580
 aatatcttca tcaccatact tttctgttaa tatgcgatta atagggctag tatcaaagtg 2640
 atagtttgta gttctatagg ctggattga tgcagggaaat tcacatggtc tactactgac 2700
 tgtaagacga tgcaaatagt taacacttaa atattgtgga aataattttt tggccttctc 2760
 atatgctaac ccaagagttc ctatgctaag ttctccatg aattcatcct tgttatctat 2820
 agatgcatac acccaatcca attttgctaa tagatctatt tgatctctct gttttttggt 2880
 taaaacttgt ctattataaa ctggcattgt tttttctctc tgtgtagatg aaccaacca 2940
 tggtttagtg ggtcctctct caccacgtgt taaactgttg acattatatt tctctatgat 3000
 tatgccacta gctatagtgc ttgttgata tttgatgtcc attgtataca tgatactggg 3060
 tgatgtaaca ccaactatat tggataaaga ccaagatctt tctctaocat atttacttaa 3120
 ttcagtaata cttaggtttt ccatactcaa tttttctctt ttatctctgt tacaacttaa 3180
 tggaatatc cttataagca aagttatgtt tttcctcacc atctcagtggt ctctatcaat 3240
 atctgttaag tctatggcag aagtctttc cagtatgta gttatagatt ttgtaccgga 3300
 tataagattt actatctctc ctgctttata aaagggtaaa ctttcataaa caactcttag 3360
 ccpgtgagga tatgtaggtt ctatattttg cataatatca ttaagatcta tctctgtagt 3420
 ggtatagtgt tgtgcacttt tggagaatat tttgtttgga gctgtgctca aaacctcagt 3480
 aactgccagt ctattgattt cactagtaat ttttagcttgcc ctctcagatc ctaaagcttg 3540
 aggatctctc atcaatgtta caaatcagc attaggggtt ttgtcaaacg tgattatgca 3600
 tgtaagaat ttattcaatc tatcatctga cagatcttga agtttatctt ttaaatcatg 3660
 gtttgataaa taactaagta tgaacacaga gtgaactata gcctctgtga gaaaatcagg 3720
 agttcttcta tagaaacttc gatataacaa gttgggatca ccaccaccaa ataacatggg 3780
 caaattcata tacaatgtta atgctgtatc aatattatca agattaaaaa aggtttttaa 3840
 gtgttttaga acctttaata tgtccaaata taatttggtg ttacataatg catgattttt 3900
 tagttgtaaa gcaatttgat tatataacca tacatttcta aatattaaac tgcataatag 3960
 actttcaoct ctatattcta attcttggtg caaactacct atagattcta gactcacttt 4020
 gaaatcatca agtatagtgt ttatccacgg tccactctt aggactttct ttatactagc 4080
 tgggtaatat acaccgttat gttggatcgt tttactcata aattgcatat ctcttgatat 4140
 ataagtctca gttcctttta atttgtggcc tatgcctgca tactctttat acagtaattt 4200
 gagactgttt aatgctagca aataatctgc ttgagcatga gtttgacctt ccatgagtct 4260
 gactggttta cttatatcta ttgattgatt gtcaccatta attaaagcag taattgagaa 4320
 tttcccttg agagatatta gatctaatag tgatatagct tctatgggcc atagtttttg 4380

ES 2 618 523 T3

acaccaccct tcgataccac ccatatgata tctatataat ccactttgct catctacatt 4440
 gttaagatct acaatatgat cccttatata ggggggtgca tgcctatatg tgcataattat 4500
 tgtgacatga ggaatagtta aatgtaacca ggaaaataga gattgtacac catgcagttc 4560
 atccagtaca tcaactacaaa tacatgatgt ttcatatcga aatgcttgat tgaatttgct 4620
 gagatctgtg atgatagagc acttactaat gtaattggtg taattatcat tgaacgatt 4680
 tgatttgta cttattcctg ctttcaattc taatattttc tgtagttota gatcaccata 4740
 tottgtaaga ctttcagga aaaattgtaa aatgttttca gctatcattt tctctgctaa 4800
 tatttgaact tgtctgaaca ttcttggtg cattgcaaac attctaccta cactgagttc 4860
 tctttcttta cctgtcaatg ataccacatg attaggggtg ttaagataac tttgattaac 4920
 tacacagttg tataaatcac attcattgaa tttgttatct cttaaatagt actctaatac 4980
 tcttcttgat ttatcactct cagagaattt taacttttca tgttctatat aattttgtat 5040
 gtgtgacggc atataatttc tagggaaact agtccatatt aaatttttag gaggtgatat 5100
 agccttatca tttatgatca ttctgagatc cactttttta ggcaatcgaa actcccgata 5160
 gaaacgtagt cctgatagaa caatcaaact tctttctgta agttccaaca aggaaggata 5220
 agtgttttag ttatagtaag ttaaccatct taagggtaaa acaatggcat tctttaaagt 5280
 aggccatctg ttgtaattat ttacaaacc ttttataatt ctatatataa aggcacctct 5340
 taacatactc aaactgctta acaagtaaaa tttggtctcg ttgcaattaa ctttaacagc 5400
 atccatggct tgtctttcat ctaccattgg gtgtccaaat attctgaaca aaaaatataa 5460
 ttcactcaga ttgtaagggt tattgtcacc tgcaagctta attaatTTTA ggaacttact 5520
 taatagaatt atccatctgc catttattat attatcggat actgtcttat ctaataatgt 5580
 atgacatact cttgatagca gatttttctg agctttatta gcagcatctg tgatgttgtt 5640
 gagcatacta ttataaaacc gttttctgaa ttgatcttct tctgttatat ttaaaattag 5700
 agacataata aatccctcta cctcttttat tatgtagaac ccctcattgt gaaatagttt 5760
 tagtatacaa tctccataaa ggaataattg tgtcaagata acattattga atccacatct 5820
 taagcctaag cttttattta atgtgttcaa acagttacta atccatgtaa tcaaacaaac 5880
 atttaactca ctaaggctaa tatctttcca tgtcaagaat tgattatagg ttgtcacagt 5940
 aattcttttg agtccttat gataaactat acaaccatat tgattcaaaa taaattggaa 6000
 tccattaaga gtatgattat ctatcaatat aaaaccatgg ttttttacct cactagatcg 6060
 atactgtgtt aatatgctgt ttaattttgt gtataaatta aaccaatgta ttaaccatga 6120
 tggaggatgt tgcacgaac acattaattt cttcaagagt gttgttttga ttgtatcttt 6180
 ttgttttgta gagtgatttt tgtctgcttt aagatgagat tgattatcct taacagctaa 6240
 aagtatatca tctttgatta tggttgtaat aactgagttg tcttcatctt gtccattggt 6300
 ggatttaate ttgtcttttt ctttaagccc cagtttattc agtatagcat agactttgac 6360
 atcactaatt tctatagctc ttcttattat ctttttaagt aaattagtgg tagtaactgt 6420

ES 2 618 523 T3

ttctgacgag gtcatactct tgtatgtcat aagtaatgac tgaaaatagg taggttcttc 6480
 tattttttatt tcacctttat gatacttaga tattaaggac tgtgttatat ttagtttctt 6540
 tagatttatg tgttctatta atggattttg tctactaatt aagttggtat aatcattttt 6600
 gagataagga ccattgaata tgtaacttcc taaagcatta cattctgaga aagaaataac 6660
 acotttttaa taactatcag ttagataaac attagcagaa tttccattaa taatgggatc 6720
 cattttgtcc catagcttga attgtttgag ttaatagttt gatgatgtgg taagcattag 6780
 gattgagtgt tatgacacta atatatatat tgtgtatata tcatcattaa tacctagatg 6840
 ttgtagaaaa ttttgagttg catcaatcaa gtcttgagag gtccaatgga tttcattgaa 6900
 tggttgattc ggtgagtata tatggttatt tgggttgggt tgattgatat atagtgtgtt 6960
 tttttgatta tacatagtaa ctctacaact acttgttatt agtatggaat ttatactaca 7020
 aggatatttg tcaggtagta tcattatttt tggcatggtc gttcgtatca ctaacagttg 7080
 attccttttg gttattgatg gttatgctct tgtggatata caatgtgttt ttgatggttt 7140
 tcttcaatac atctgccggc aatcttttta acagatgaat agtttgttta ttgtttttcc 7200
 tgttgctttc aatatatgat atgacagtat tgtacactct tatcttgggt gaatttggct 7260
 cttcattgtc ccttagtttt ttgatgtcat cactgttgag ttcagtgagg agtttgtctca 7320
 tggcaacaca tgctgattgt ttagttatat tatttattga tcctatataa ctctctagca 7380
 ctccaactac accgagggca tactcttctg ttctgtccaa ctctgcagct ccacttattt 7440
 ctgataaagt atctatgctt ttatccatag acttaagtat tctgtttaac ataaaatttt 7500
 gtcttacaag cagtgcattg ggtggccatt caaaataatt atgactaaaa tggcacctct 7560
 tgccattcaa gcaatgacct cgaatttcaa atttgcaagg attccttctg gacatatttg 7620
 cccagttct tattttttaca aatagtaagt taatctggta ttcaattggt ttatataact 7680
 ataaaatagg aatctactta aatagtgtaa gtgagatgggt ttatagatga aagttgtgat 7740
 gaagttcaaa ttttaagaaa atccaatgat agatgggtta tctatgggtta gatagtgaac 7800
 cattgtaaga atatgattag gtgctatttt tattcagcta ctaaattgcaa tattgtttat 7860
 accactcagt tgatccttac ttagtgtgac tgggtgtgctt ctggccttgc aatatagaag 7920
 cagtccaact gcaattaatg ataacaatat tactataatc actataatta tagtagttat 7980
 catgatattt gtggtggatt taccagcatt tacattatgt aataattcat ctgatttacg 8040
 aataaatgct agactctgggt taatcttctc attgacttga gatattgatg catcaaattc 8100
 atcagagggg aacactaatg ggtcatagaa atttattatt gggtcacctt ttacatagag 8160
 acttttgctt tcttgcttat ttacataata taatgtatta cctacagaca cagtatccac 8220
 ccccttattt gatacataat cacaccctgt agaaaatgtc tttatgatcc caggtatttt 8280
 attggatgct gtacatttag ttttgccata gcatgacaca atggctccta gagatgtgat 8340
 aacggagctg cttacatctg tttttgaagt cataattttg caatcatatt tggggttgaa 8400
 tatgtcaatg ttgcagagat ttacctcact tggtaatggt aaactgttca ttgtatcaca 8460

ES 2 618 523 T3

aaatacccgga tttgattgaa ctttacatgt ttcagcttgt ggggaagaaag atactgatcc 8520
 tgcattgtca cagtaccatc ctctgtcggc tcttgtaag cagatgttgg acccttcctt 8580
 tgtgttggtt gtacatagtg gggatgtgtg cagtttccaa caaggtgtat ctattacacc 8640
 atatagtggc aattgtacta catatgctaa gacttcctcc tttattatgg acatgataga 8700
 gtaactttgc tgtctaacta tttgaacatt gttggacatt aactttttct gatcatttgt 8760
 tataggcata tcattgatta atgataataa ttcactatta gttaacatat aagtgcctac 8820
 aggtgtagtt acacctgcat tgacactaaa ttccctggta atctctagta gtctgttgtt 8880
 cttttgttgg aattctatca cagtttcaat gtttgatatg ctgcagcttt gcttgttcac 8940
 aataggtaac aactgtttat ctatatagtt tttgagatct aacactttgc tgggtaagac 9000
 actgactcca tttgataagc tgactacagc cttgtttgtg gatagtagag cacttttgat 9060
 tttgttctact tccccttcta ggtgcaagac cttggatacg gcaatgccac tggcgattgc 9120
 agatccaaca cctaacaaaa agccaagaaa tcttcttttc ctttcttgc ttaatgttac 9180
 attggtgttt ttggcattgt tgagtgtata attcataaat cttggtagtt ctcttctggc 9240
 togattgttg gctgctggcg tgctttgcat gagcaattgt aattctgtta cagcattttt 9300
 atatttatct aattcttgtt ttatcaattt taccttagcg tctgttccat tacacttatt 9360
 ttccctgata gtacttaatt ctatagttat aacactagta taccaaccag ttcttagagc 9420
 gctaagatag cccttgctaa ctgcactgca tgttgattga tagaattctt cagtgatgtt 9480
 ttgactggaa gcgaaacaga gtgtgactgc agcaaggatt gtggtaatag catttgtttt 9540
 gaggattggc aactccattg ttatttgccc catagttgat tttgattctg tttgatttgg 9600
 tcatggcttt ttgcaataat acgcttttta atgactactg gtttgttgtg ttggatggag 9660
 atagagattg tgataggtag tcggatgttg tatagacttg tgaagggtt ggattgcctt 9720
 cggaggtggc tgagtggaga gtttcctttt gacttgtgtg ttctggattt cctgtgggtg 9780
 tggaggtgag cagtgtagtt ctgatgtttg ttttgggtgg gttgatggtt ggcttttctg 9840
 tgggcctggc ggtaagtgct tectttgggt ttgtggtttg aggtttgaga tcttttttgg 9900
 ttgtcttgat ggttgggttt cttgtgggct tgggtgggtt tttctttcca ggttttttgt 9960
 ttggtattct tttgcagatg gccagcaag ttggattgtt gctgcatatg ctgcagggtg 10020
 caaagttgaa cacttcaaag tgaaaatcat tatttgggtt gttttgtggt ttgttttggc 10080
 gttgttttgt ggtgggcttg ctgggttga tttgggttgt tgtgtgtttt ttggctctga 10140
 ctgttgtgga ttgtggggtt gacttagcac ttgggttgt tgaagctagt gtgggtgggtg 10200
 gttgtgatgt agtttcggac agattggaga ggctgattcc aagctgggga ttctgggtga 10260
 ggtatgttgg ggttgtgttc ttgatctggc ttgttgcac ttgtatgatt gcagttgttg 10320
 gtgtgacttt gtggtttgc gaggctatga atatgatggc tgcaattata agtgaagtgt 10380
 agattatcat tgccaaaata gataatgtga tttgtgctat agatttaaga ttttaactgt 10440
 ataagcacga tgatatgaat aatagatgat tgagagtgtc ccaagtctt tctagtgtct 10500

ES 2 618 523 T3

tggcggcgcg ttggtccttg gttttggaca tgtttgcatt tgccccaatg ttgttgttgg 10560
 tcttaatat ttagttcatt gttatgacta ttttctaatt aactacttta tggatatagat 10620
 gatggccttg atggtgagac gttgatgtgg ttttgtgaag aggtgagggg agttcactta 10680
 caaatgcaag gttactgttt tgagctatca gattggtgaa tgctatgtat tgactcgagc 10740
 tcttggtagc tcaaagggtt tgttatggaa tatgttatat tgcagagtt tgtttagtat 10800
 tgcaatcatg atggagatta tgattagcaa agagattatt gttgttatca tgtgtattag 10860
 tgtaaagtaa ggccagaatt tgcttgagaa ttctattggt atggatgtat tttccattgg 10920
 ttgattttgt ctaatgtgtt gactagtcta tgttgacaga tgttgtgatt agttggattc 10980
 ctctcaatga ttatttgccc catgtggatt ttttattaac ttatttgagt actggatctg 11040
 atgaacaatg acttgggatg atctgagact cctgatgagt tttgtttgat tggttgaacc 11100
 acaaagggtt ggtgattacg attgtgaagt gaagaatgta ggtagaaagt ttgtatgaat 11160
 caactcactg atgtagagga aaaaggtaa tcttccatgg gtttgattgc aaatcgtgta 11220
 gctgtgtgct tccaatttgt tgtaacataa tatatacttt ctttttctaa gtaagctcca 11280
 agatctacta tgaattgact ttgtggcttt atgtatttga atgctccttt gttgtcagtc 11340
 actgtgatga ctaacagtaa tcttgagtaa gggatgattt ttgcatttgt aatagcattt 11400
 ttgaattcag tggttgttat attttcaagt gtgttcagat ctttatttct gacactgatg 11460
 gatctcaggt atgttggat tatgactttt tttgatgtta ctatatttcc aaattcacat 11520
 aaagcaatga tgtcatgtgt tgggttgagt gttttcatag tgagatcttt aactgtagtt 11580
 aacataattt ttgatttttag gcatgttaga ctgcatgcct taatttcaca ggggtgtggtt 11640
 acatcatatg ccagcttgct tctttcatcc aaggacacat tggcacatat ggtaaatttg 11700
 ctgggcattt gcgctagcac tgcacttctt gagtttatca tgactcttaa tgatggctcc 11760
 ttgggtgtgg atatttgtt cactagtata ttgacattgg ctagttcttt tataagtaaa 11820
 tctgctggca tggatgattg gaacatgggc acccatattg taagtgatgc aggatcatcg 11880
 tcttttctca ggacattgta ttgaacagca gctgtgtatg tggagccctc gtgaagtttg 11940
 ttcacgatg tttccatatt tgccccatct tttttgtaa ctatagtatc gatttttcc 12000
 ggggtggctag ttttggattg gctggttgtt tttttggctg gttggctaata cggcaaatgg 12060
 atgtttggtt ggatgggtga attggttgtt ttgtagtct tctattgatg ttgtgttttg 12120
 atgtgcagat aggtagctaa tcagaaatct tcaagtgata gatcattgtc actatcattc 12180
 cctccaaca ggttgttcaa tttttctgat gttggattga gagacattc atctgatgtg 12240
 tcttttgcca tcttttcaact ttctcattc ctgagctctg ccatagcttc tagtctgtca 12300
 ttggtcatta atgcttcagt tctgattttt tctatcattt cttctcttaa accaaccatg 12360
 gcatctctta taccatcccg agcagatgta ggtcctgcac tgcctactac taatgtgtga 12420
 agcattccta gtatttcaact taatttctca tcaatcctat ctaatcttgc tgttatatta 12480
 tcgtttgtct ggtcattaat ttcttcatat gaatagctag attcttcttc attgttatca 12540

ES 2 618 523 T3

aatgtttcta tggtttcttt gtatagtttt gaaaagggat tatcacttgg cgtagggtct 12600
tctttgaaac ttactagagg ttttctttga taattgggct tgttccctac agtatcatct 12660
gtctcattta ttgggtttat aatggttgaa tttgatgtta tagggctttc tttggttact 12720
tctatatcta ttgagttgac agatatgata ctatcttttt tcttgggatc tttgggtgat 12780
gtgaatttgc cctttattga ttctaggaat ttggtggctc tgttgtttgc atcttctcca 12840
tggaaattcag gagcaaactt ttccatgatg ttttatttgc cccatttttt ttattaactc 12900
aaagctctac atcattatct tttggattaa gttgatgttt gatagcctct agttcttctg 12960
ctgtcaagtc taatacactg tagttaatca caccattttc tttgagttgt tcagcatatg 13020
cttttgcagc atcatataga tcttgattcc ttggtgtacc tctgtattct cccattatgc 13080
ctaggccagc agcattgcct aatactacac tagagaagtg aggaaattga gtcaaagata 13140
ataatgatgc ttttgggttg ttcaatatat ggtagaatcc tgcttctcca cccaattttt 13200
gggcatattc atacacctcc acaacctggt ccatttctgc ttgcacacta gcgtgtccta 13260
acataatatt ttttaactgat tttgctaaga cccccaccg taacatcact tgccctgcac 13320
cataggcatt cataaacaat cctgcaaaga tcccttcaac tctactgcca cctctggtag 13380
aagattgtgc tataccaaaa tgaacaaaaa catctataaa gtgaggatat ttttcaaaca 13440
cttcatagaa gctgtttgct atatccttgg gtagtaagcc tttataacgt ttcatttcat 13500
tttttaagac attattagct ctctaatca cagctgtaag accagatcta tcccctgctg 13560
ctaatttggg tattactaat gccgctatac ataattat catcccaca tcaggagagt 13620
catgcctgta ttctggagcc acctctcca tttcttttag catttttttg taggattttc 13680
tagattotat ctcaatgttg atttgaattt cagttgttaa gcttgcta at gttaacactt 13740
caaatttcat ttctttocca ttaatgtctt gacgatgtgt tgttacatcc actccatttg 13800
ctttaacatg atatcccgca tctttgagta tttttatggg gtcttctctt cctaacttag 13860
acatagcata taacatacct attaaccag tgaatttatg attagcatct tctgtgatta 13920
atagcatgcc acatagcttg ttgatgtgtt tctgcacatc ataattagga gtgtcaatgc 13980
tatctcctgt gctccgttgg atagtgtatt tgctggatga cagaagttga tctttgttga 14040
gtgtatcatt caacttgact ttgctaagag ccatttttgt atttgcccc tctttcatct 14100
tatgtctctc ctttaattta aattactata attttcaggc tccatttggga ctatggagtg 14160
tgattgtgca tgaagttatt atttcagatt gtttgaatct tgttttgaaa ttcattggatt 14220
gagatcatac ttgtatatta tgggtgtgtg cttagtaggc ttaatgcca tgcatctaa 14280
gaaccatca tgattgataa atattggcat agggaaagtg ccatattttg tgttgtattc 14340
agtatatttt ttatatttag tgcttcccac tttgtgcaat agtttcattt catagttagc 14400
caggaatgta aatgtggcct gtctttcatc aagttttctc actatgcatt catgatttat 14460
caagtatata aatctatgtg ttatgatgtc tctgggttagt gatgttatta tagtctcaag 14520
tgacaatggg ctcatgtcag tgatcatcag tctttgtggg gtggatcat tgtgtgttgt 14580

ES 2 618 523 T3

gtccatgggt gggtcagctt agttgattta tttgccccat ttttatcttc tgtcaagttt 14640
 tatattaact aatgggtgta gtgacattga tttgctagtt gatatttatt ataatttatg 14700
 gattaaggtc aatccaagt aattcagata attgattcat ataattggtc attgttgaat 14760
 cacttagttt tttggagaat ttaatttcac aattgtcatc tattaggcca ttaggttgag 14820
 agcaatgcgt taattccatc atttcccata tataacctcc attttgtaat actggcattg 14880
 ttgtgaagtt ggatttcact acaatattat tattagggca aatatcacta cttgtaataa 14940
 catgcacaaa tacaatgcca ttcaatttaa ttgtatgtat aactgcctta gccaaagcat 15000
 tagttaactg tattaatttg tcagtatagc atgttatttt taacaatgct acttcatcat 15060
 tgtcaaaaaa attttgcaat ctaactttta tcatactcaa tgagttgctg cccatctcta 15120
 accaaaggag taaaatttaa gtggacttta tcaaattott atttgcccc ttttttgggt 15180
 ttacgcaagt ttgttgtagc cattttttcg cgt 15213

<210> 2
 <211> 47
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 2
 aattggtacc taatagcact cactataggg acgagaaaa aaggtc 47
 <210> 3
 10 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 3
 ttaaacgcgt catcaaacta ttaactc 27
 15 <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 4
 20 aattacgcgt taagcattag gattgagtg 29
 <210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25 <400> 5
 ttaaggatcc gcgcgctatt attgcaaaaa gcc 33
 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <400> 6
 aattgcgcgc ttttaatga ctactgg 2
 <210> 7
 <211> 38
 35 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 7
 ttaaggatcc gtacgttggg gcaaatgcaa acatgtcc 38
 <210> 8
 40 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 8
 ttaaccggg gcaataaaa catcatgg 28

ES 2 618 523 T3

<210> 9
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <400> 9
 aattcgtacg tattgttagt cctaatatct tagttcattg ttatga 46
 <210> 10
 <211> 32
 <212> DNA
 10 <213> Artificial
 <400> 10
 aattcccggg attttttta ttaactcaaa gc 32
 <210> 11
 <211> 43
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <400> 11
 ttaaacctgg taagatgaaa gatggggcaa atacaaaaat ggc 43
 <210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 12
 aattggatcc accaggtctc tccttaatt taaattac 38
 <210> 13
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 13
 aattccttaag ggaccgcgag gaggtggaga tgccatgccg acccacgcga aaaaatgcgt 60
 30 **acaac** 65
 <210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <400> 14
 gtccgacctg ggcacccgaa ggaggacg 28
 <210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 40 <213> Artificial
 <400> 15
 acgtcctct tcggatgccc aggtcg 26
 <210> 16
 <211> 68
 <212> DNA
 45 <213> Artificial
 <400> 16
 tcgtccactc ggatggctaa gggataaacc ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg 60
 ttttttgc 68
 <210> 17
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 17
 ggccgcaaaa aaccctcaa gaccgttta gagccccaa ggggtattc ccttagccat 60
 55 ccgagtggac g 71
 <210> 18
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 60 <400> 18
 ttaactcgag ttattcatta tgaaagtg 29
 <210> 19
 <211> 27

ES 2 618 523 T3

<212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 19
 5 aattggtacc gggacaaaat ggatccc 27
 <210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 20
 10 ttaatctaga ttgtaactat attatag 27
 <210> 21
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <400> 21
 aattggatcc ggggcaaata aatcatcatg g 31
 <210> 22
 <211> 29
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <400> 22
 aattggatcc ggggcaaata caagatggc 29
 <210> 23
 <211> 31
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 23
 ttaactcgag attaactcaa agctctacat c 31
 <210> 24
 30 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 24
 aattggatcc ggggcaaata tgtcacgaag g 31
 35 <210> 25
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 25
 40 ttaatctaga tcaggtagta tcattatgtt tggc 34
 <210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 45 <400> 26
 ttaatctaga agtaactact ggcgtg 26
 <210> 27
 <211> 44
 <212> DNA
 50 <213> Artificial
 <400> 27
 aattggatcc ggggcaaata caaacatgtc caaaaacaag gacc 44
 <210> 28
 <211> 32
 55 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 28
 aattccatgg ggtccaaaac caaggaccaa cg 32
 <210> 29
 60 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <400> 29
 aaaagtatac ttaatgtgat ttgtgctata g 31
 65 <210> 30
 <211> 44

ES 2 618 523 T3

<212> DNA
<213> Artificial
<400> 30
5 tttgtatac tggcagctat aatctcaact tcactataa ttgc 44
<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<400> 31
10 aatttctaga tttttaatga ctactgg 27
<210> 32
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial
15 <400> 32
ttaatctaga cgttacgcca acgccaagtc c 31
<210> 33
<211> 41
<212> DNA
20 <213> Artificial
<400> 33
aattaagctt accatggaca cgattaacat cgctaagaac g 41

REIVINDICACIONES

- 5 1. Virión de un pneumovirus que comprende un genoma viral que tiene un gen de la proteína G de fijación eliminado o inactivado, donde el virión comprende una proteína G de fijación del mismo subgrupo viral que el genoma viral, en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión.
2. Virión según la reivindicación 1, donde el pneumovirus es un virus respiratorio sincitial.
- 10 3. Virión según la reivindicación 1 o 2, donde la proteína G de fijación en el virión es homóloga del genoma viral.
4. Virión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la mutación hace que el virus producido a partir de solo el genoma viral carezca de la proteína.
- 15 5. Método para producir viriones pneumovíricos, los viriones comprenden un genoma viral que tiene un gen de proteína G de fijación eliminado o inactivado, donde el virión comprende una proteína G de fijación del mismo subgrupo viral que el genoma viral, en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión, el método incluye las etapas de:
 - (a) infección de un cultivo de una primera célula huésped con un pneumovirus que comprende un genoma viral que tiene un gen de proteína G de fijación eliminado o inactivado, donde la célula huésped comprende un vector de expresión que dirige la expresión en la célula huésped de una proteína G de fijación del mismo subgrupo viral que el genoma viral, en una forma y en una cantidad que es necesaria para la infectividad del virión; y,
 - (b) recuperación de los viriones a partir del cultivo de la célula huésped infectada.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, donde el pneumovirus que se usa para infectar el cultivo de un cultivo de la primera célula huésped, se produce en un método que incluye las etapas de:
 - (a) proporcionar a una segunda célula huésped uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión en la célula huésped de:
 - 30 i) un ARN genómico viral que tiene un gen de proteína G de fijación eliminado o inactivado;
 - ii) un complejo enzimático de polimerasa pneumovírica y opcionalmente una o más proteínas virales; y,
 - (b) cultivo de la segunda célula huésped por la cual los viriones son producidos.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, que comprende además la amplificación de los viriones producidos por la segunda célula huésped por una o más etapas de infección celular utilizando células huésped que son iguales o diferentes de la segunda célula huésped.
8. Método según las reivindicaciones 6 o 7, donde el ARN genómico viral es transcrito a partir de una copia de ADN viral que está bajo el control de un promotor de ARN-polimerasa dependiente del ADN de bacteriófago y donde la célula huésped está provista de un vector de expresión que dirige la expresión en la célula huésped de la ARN-polimerasa dependiente del ADN de bacteriófago.
- 40 9. Método según la reivindicación 8, donde la ARN-polimerasa dependiente del ADN de bacteriófago es la polimerasa el T7, T3 o SP6.
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde el complejo enzimático de polimerasa pneumovírica al menos incluye las proteínas L, P, N.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde una o más proteínas virales es una proteína de membrana de matriz pneumovírica, preferiblemente la proteína M2-1.
- 50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-11, donde el pneumovirus es un virus respiratorio sincitial.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-12, donde la proteína G proteína de fijación en el virión es homóloga del genoma viral.
- 55 14. Composición que comprende un virión tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, u obtenible en un método tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5-13, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60 15. Uso de un virión tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la producción de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección pneumovírica.
16. Uso según la reivindicación 15, el medicamento es una preparación para la administración intranasal.

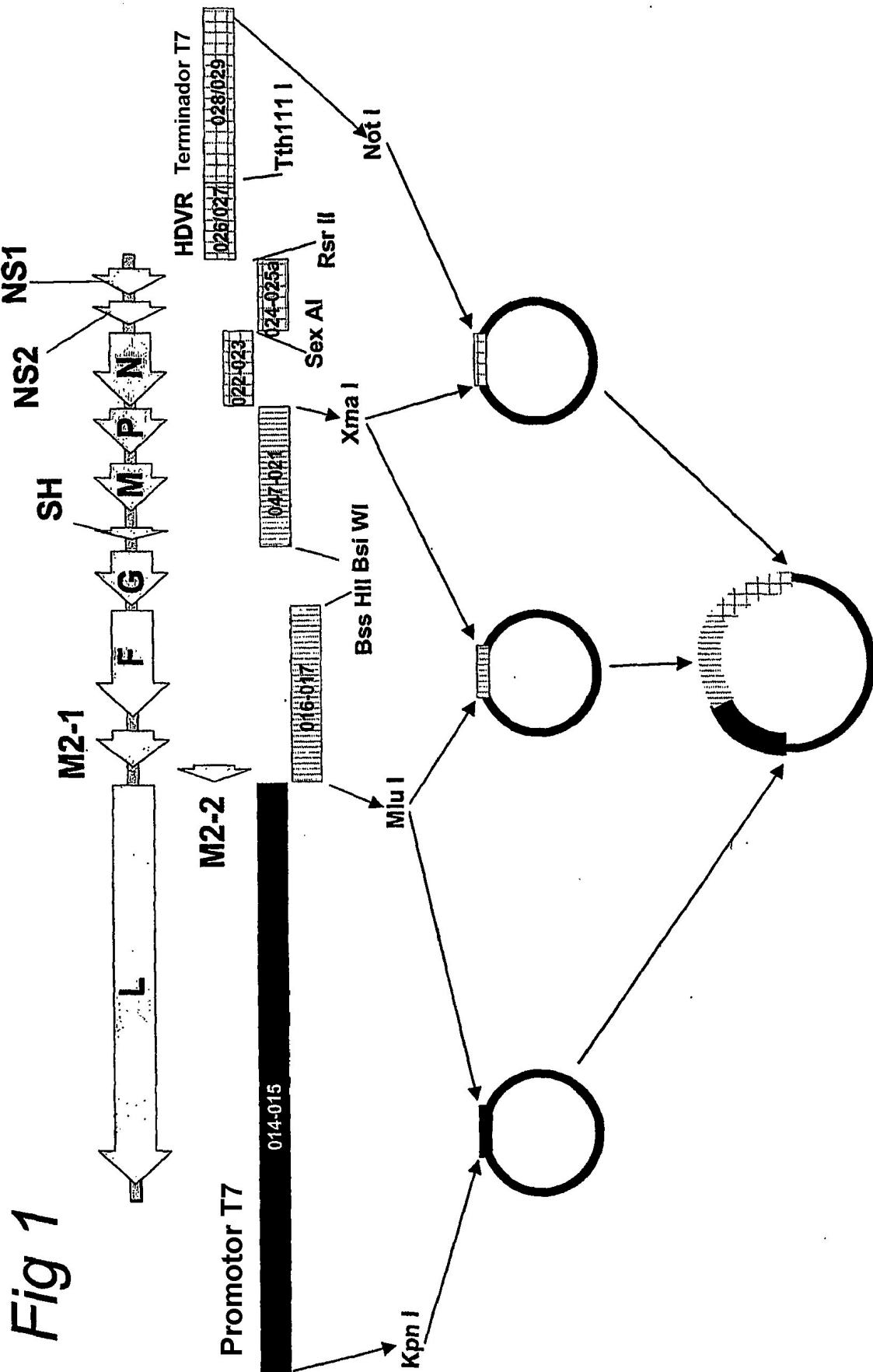


Fig 2.1

Región intergénica entre L y M2-2:

RSV-X ATTTGTCCCATAGCTTGAATTGTTGAGTTAATAGTTTGGTGGTAAGCATTAGGATTGAGTGTTA
 pRSVXΔG C.C.T.....

MluI

Región intergénica entre P y N:

RSV-X AAACTTTTCCATGATGATTTATTTTCCCC---ACTTTTTATTAACT
 pRSVXΔG T.....GGG.....

XmaI

Región intergénica entre N y NS2:

RSV-X ATTTGCCCATCTTTCATCTTAT---GTCTCTCCTTAATTTTAAATTACT
 pRSVXΔG CCAG.....

SexAI

Fig 2.2

Región de delección de gen G:

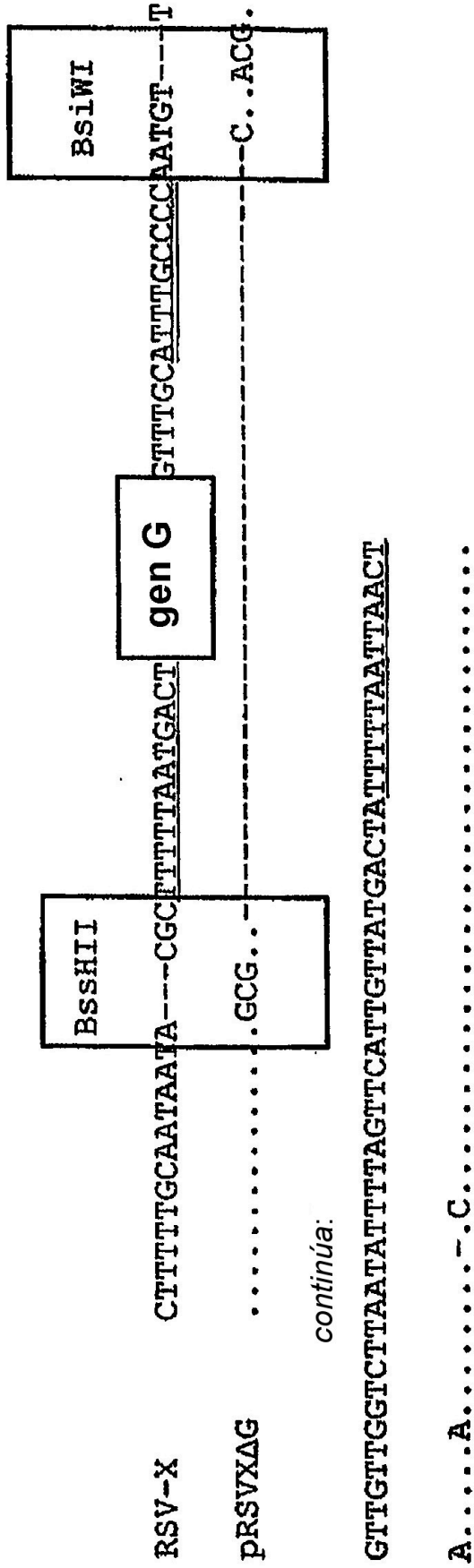
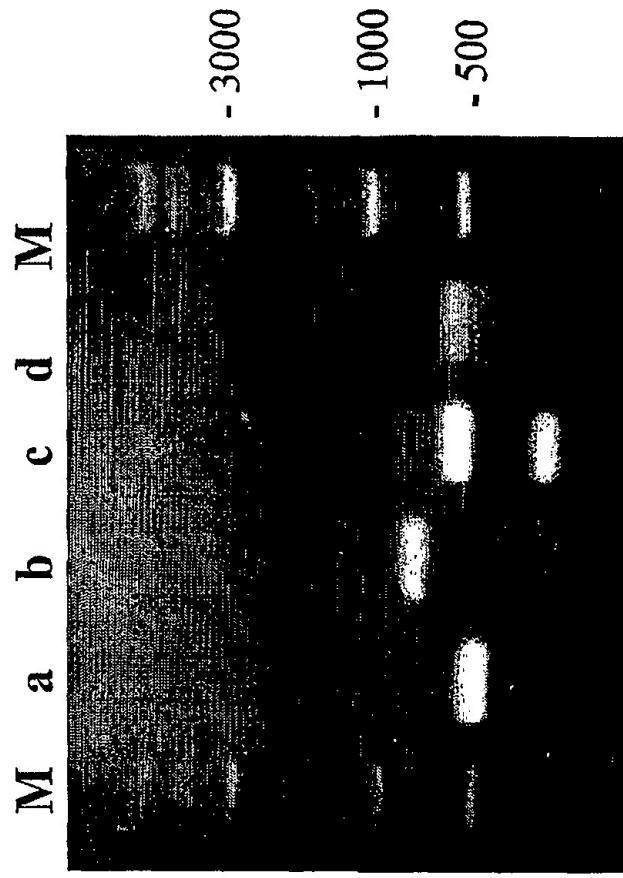
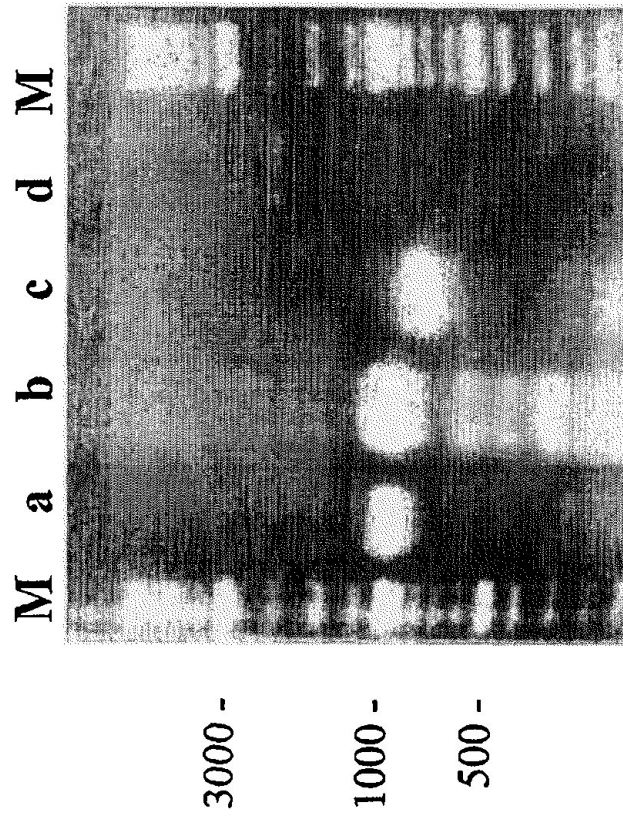


Fig 3



Aislado X de ΔG-RSV



Aislado X de RSV

Fig 4a

Aislado X de Δ G-RSV

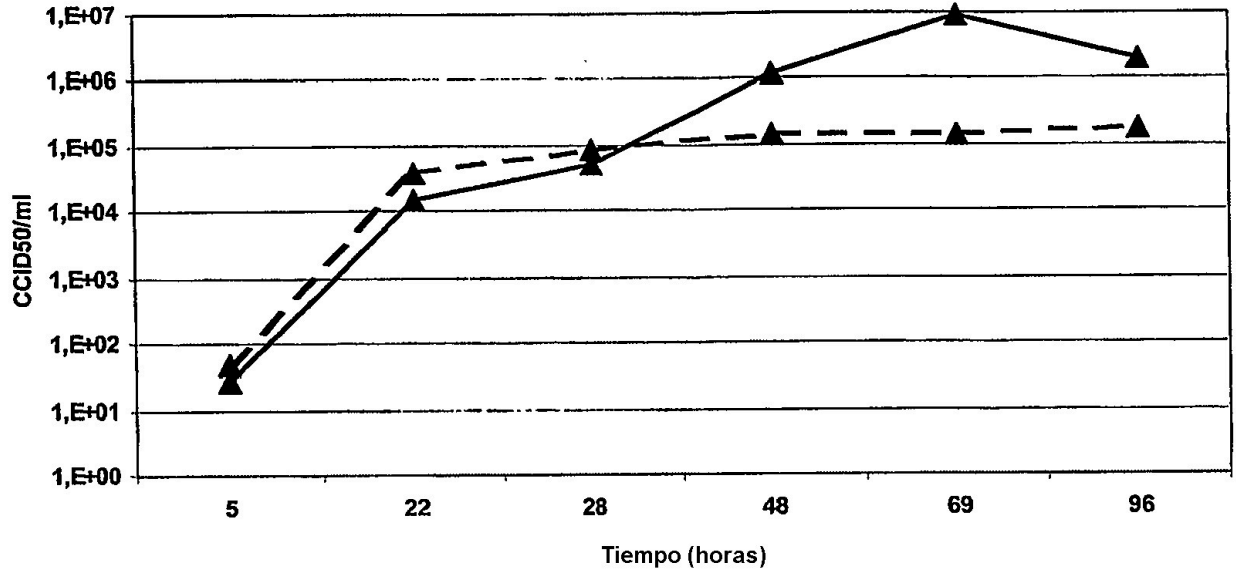


Fig 4b

Aislado X de RSV

