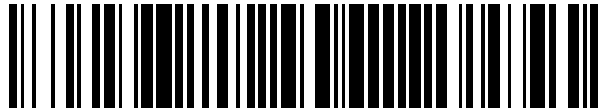


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 797**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/US2012/033482**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12148708**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12777657 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2702159**

54 Título: **Vacuna de virus Sendai modificado y vector para la obtención de imágenes**

30 Prioridad:

28.04.2011 US 201161480008 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2018

73 Titular/es:

**ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH (100.0%)
262 Danny Thomas Place Mail Stop 742
Memphis, TN 38105, US**

72 Inventor/es:

**HURWITZ, JULIA, LEA;
TAKIMOTO, TORU;
RUSSELL, CHARLES, JOHN;
PORTNER, ALLEN y
SLOBOD, KAREN, S.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 689 797 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

Vacuna de virus Sendai modificado y vector para la obtención de imágenes

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a vectores de virus recombinantes, a métodos para construir vectores y al uso de tales vectores. En particular, la presente divulgación proporciona métodos, construcciones de virus recombinantes y composiciones, y kits para un vector vírico de Sendai de la cepa Enders modificado para la protección frente a patógenos. Además, algunos aspectos incluyen vectores para obtener imágenes o rastrear la propagación, la eliminación y la transmisión víricas.

Antecedentes de la invención

15 La vacunación es el mecanismo más eficaz para el control de enfermedades infecciosas, sin embargo, aún existen numerosos patógenos para los cuales no existen vacunas. Por ejemplo, los paramixovirus incluyen una serie de patógenos humanos importantes transmitidos a través de la vía respiratoria, tal como el virus respiratorio sincicial humano (RSV, forma sigla de *respiratory syncytial virus*), los virus paragripales (los PIV, forma siglada de *parainfluenza viruses*), el metapneumovirus humano, el virus del sarampión y el virus de las paperas (Brown et al. 2007 J. Virol 81:12535; Hall et al. 2009 N. Engl. J. Med. 360:588). Los PIV humanos (los hPIV) constan de cuatro serotipos (hPIV1-4) y, junto con el RSV y el metapneumovirus, son las causas más comunes de infecciones víricas de las vías respiratorias en niños. Los PIV, el RSV y el metapneumovirus se transmiten de forma eficaz por contacto directo y por la exposición a secreciones nasofaríngeas (Hall et al. 2009 N. Engl. J. Med. 360:588; Hall et al., 1981 J. Pediatr. 99:100). Casi todos los niños se infectan con el RSV a la edad de 1 año, con hPIV3 a los 2 años y con hPIV1 y hPIV2 a los 5 años (Schickli et al. 2009 Hum.Vaccin. 5:582; Graham et al. 2011 Immunol. Rev. 239:146). En Estados Unidos, El RSV puede representar hasta el 20 % de las hospitalizaciones de niños pequeños en una temporada de RSV, con costos anuales de hasta 400 millones de dólares (Hall et al., 2009 N. Engl. J. Med. 360:588; Schickli et al. 2009 Hum.Vaccin. 5:582; Graham et al. 2011 Immunol. Rev. 239:146; Shay et al.2001 J. Infect. Dis. 183:16; Shay et al. 1999 JAMA 282:1440; Paramore et al. 2010 Pediatr. Pulmonol. 45:578; Hall et al. 2001 N. Engl. J. Med. 344: 1917; Bourgeois et al. 2009 Pediatrics 124: e1072; Boyce et al. 2000 J. Pediatr. 137: 865). Para pacientes con bronquiolitis y neumonía, el RSV se ha identificado como el agente etiológico en hasta el 90 % y el 50 % de los casos, respectivamente (Paramore et al. 2010 Pediatr. Pulmonol. 45:578; Hall et al. 2001 N. Engl. J. Med. 344: 1917). No existen vacunas autorizadas para ninguno de estos patógenos humanos.

35 El virus Sendai (SeV) representa una vacuna y un vector de vacuna atractivos. Puede actuar como una vacuna jenneriana para el hPIV-1, la causa principal de laringotraqueobronquitis (laringotraqueítis aguda pediátrica), basándose en la secuencia de aminoácidos y en las similitudes antigénicas entre los dos virus (Gorman et al. 1990 Virology 175: 211; Dave et al. 1994 Virology 199:376; Smith et al. 1994 Virology 205: 453). El SeV también puede manipularse por genética inversa para producir vacunas recombinantes que podrían vacunar frente a prácticamente cualquier otro patógeno (o patógenos) de elección. La conveniencia de un vector basado en el virus Sendai depende de lo siguiente: (i) capacidad de rescate fácil mediante genética inversa, (ii) capacidad de portar un gen marcador para el rastreo de *in vivo* e *in vitro*, (iii) sustento de la expresión e inmunogenicidad de proteínas extrañas cuando los genes respectivos se introducen en distintas posiciones dentro del genoma de SeV, (iv) crecimiento limitado en primates, (v) suficiente capacidad de replicación para sustentar la vacunación e inmunogenicidad en primates. Debido a que los hPIV y el RSV provocan la mayoría de las infecciones de enfermedades víricas respiratorias en la población más vulnerable de niños, bebés y ancianos, se necesitan nuevos métodos y composiciones para proteger a los seres humanos frente al virus paragripal y las infecciones por virus respiratorio sincicial.

50 La cepa Enders del virus Sendai es bien conocida en la técnica, como por ejemplo la ilustrada en Vaccine, 26, 2008, 3480-3488.

El documento US2010/196993 describe un vector de virus Sendai recombinante modificado basado en la cepa z con una proteína L mutante que tiene una modificación en la posición 214.

55 **Sumario de la invención**

La invención a la que se refiere la presente memoria descriptiva se expone en las reivindicaciones adjuntas a la presente descripción.

60 La presente divulgación se refiere a vectores de virus recombinantes, a métodos para construir vectores y al uso de tales vectores. En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos, construcciones de virus recombinantes y composiciones, y kits para un vector vírico de Sendai de la cepa Enders modificado para la protección frente a patógenos. Algunos aspectos incluyen vectores para obtener imágenes o rastrear la propagación, la eliminación y la transmisión víricas. En un aspecto, la divulgación se refiere a un nuevo vector de vacuna de virus Sendai recombinante con los siguientes atributos: (i) capacidad de rescate fácil de vectores recombinantes mediante genética inversa, (ii) capacidad de portar un gen marcador para el rastreo de *in vivo* e *in vitro*, (iii) sustento de la

expresión e inmunogenicidad de una proteína (o proteínas) extraña cuando el gen (o genes) respectivo se introduce en distintas posiciones dentro del genoma de SeV, (iv) crecimiento limitado en primates, (v) suficiente capacidad de replicación para sustentar inmunogenicidad en primates. Además, algunos aspectos también proporcionan un atributo de (vi) crecimiento limitado a 33 °C e incluso menor crecimiento a 37 °C. Los aspectos divulgados presentan un equilibrio inesperado de atenuación del vector del virus, crecimiento del vector del virus, capacidad para la expresión de genes extraños e inmunogenicidad para mantener cada uno de estos atributos deseados.

En un aspecto, la divulgación proporciona un vector que es inesperadamente superior a otros vectores de SeV, que incluyen cepas Enders o Z no modificadas, porque se puede rescatar fácilmente y presenta tanto atenuación como inmunogenicidad en primates. Además del uso como vacuna, la presente divulgación contempla en un aspecto que los métodos, las construcciones y formulaciones de virus recombinantes y los kits, facilitarán el uso de este vector de virus Sendai como herramienta de laboratorio o en un contexto de investigación preclínica/clínica.

Aunque no es la intención que la presente divulgación se limite a la protección frente a los paramixovirus, se contempla que cualquier gen extraño (o porción del mismo) que codifica un inmunógeno de interés se pueda insertar en el vector de vacuna de las realizaciones de la invención. Por ejemplo, pero sin limitación, la presente divulgación contempla realizaciones en que el gen extraño se selecciona de genes de RSV, PIV y VIH, incluyendo fragmentos, homólogos, análogos, y cualquier otro gen de interés, para tener como objetivo un patógeno/enfermedad de interés. Además, en un aspecto, la divulgación contempla un vector de virus Sendai recombinante que comprende un gen extraño que codifica al menos uno de una proteína del virus respiratorio sincicial (RSV), una proteína de virus paragripal humano (hPIV), un fragmento antigénico de las mismas y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente el vector de virus Sendai recombinante, en donde la proteína de RSV se selecciona del grupo de una proteína G de tipo A, una proteína F de tipo A, una proteína G de tipo B y una proteína F de tipo B. En otros aspectos, el método comprende adicionalmente el vector del virus Sendai recombinante, en donde la proteína de hPIV se selecciona del grupo de una proteína HN de tipo 1, una proteína F de tipo 1, una proteína HN de tipo 2, una proteína F de tipo 2, una proteína HN de tipo 3 y una proteína F de tipo 3.

En otro aspecto más, la divulgación contempla un vector de virus Sendai recombinante que comprende un genoma de Sendai cepa Enders modificado con un gen extraño que codifica al menos uno de una proteína del virus respiratorio sincicial (RSV). En algunos aspectos, el vector de virus Sendai recombinante incluye dicho gen extraño insertado entre un gen F del virus Sendai y un gen HN del virus Sendai.

En otro aspecto más, el gen o genes extraños pueden ser cualquier otro antígeno extraño de cualquier patógeno.

En otros aspectos más, el gen extraño se inserta entre un gen P del virus Sendai y un gen M del virus Sendai. En aún otros aspectos, el gen extraño se inserta entre un gen M del virus Sendai y un gen F del virus Sendai.

En aspectos adicionales, el vector recombinante del virus Sendai incluye métodos para la creación de una vacuna de Enders modificada que comprende una quimera de las cepas Enders/Z para facilitar el rescate de un vector de virus infeccioso a partir de ADNC y para asegurar que el virus es atenuado, pero inmunogénico en primates. En un aspecto, la quimera de las cepas Enders/Z es un vector en donde una porción del gen L de la cepa Enders se reemplaza por la porción correspondiente de la cepa Z del virus Sendai. En un aspecto, el gen L del virus Sendai se modifica de tal manera que contiene un ácido nucleico que codifica los siguientes cambios de aminoácidos de la cepa Z: S a G en la posición 155, R a K en la posición 258, G a E en la posición 466, G a E en la posición 482, S a R en la posición 581, Q a R en la posición 717, T a I en la posición 800 y R a K en la posición 852.

En otro aspecto, la presente divulgación contempla una composición que comprende el vector recombinante de virus Sendai y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o cualquier vehículo, adyuvante o diluyente.

La presente divulgación contempla un método que comprende: a) proporcionar: i. un sujeto que necesite vacunación frente al RSV; ii. uno de los nuevos vectores de Sendai descritos en el presente documento en donde el vector comprende un gen de RSV o una porción del mismo; y b) administrar dicha composición a dicho sujeto en una cantidad eficaz para suscitar una respuesta inmunitaria.

En aún otro aspecto, la presente divulgación contempla un vector de virus Sendai recombinante que comprende un genoma modificado de Sendai de la cepa Enders con un gen extraño (o una porción del mismo) insertado en medio de una unión intergénica seleccionada del grupo que consiste en las uniones de genes N-P, P-M, una M-F, F-HN, una HN-L o cualquier otra posición (o posiciones) dentro del genoma. En una realización, el gen exógeno es un gen indicador. En un aspecto, el gen indicador puede ser luciferasa, pero puede (en otro aspecto ser cualquier otro gen indicador (por ejemplo, un gen que codifica una proteína fluorescente).

En aspectos adicionales, las secuencias de inicio o detención de la transcripción en el genoma del vector del virus Sendai pueden alterarse para aumentar o disminuir la transcripción de los genes cadena abajo. Por ejemplo, la secuencia de iniciación de la transcripción del virus Sendai cadena arriba del gen F del virus Sendai puede mutarse de AGGGATAAAG (SEQ ID NO:19) a AGGGTGAAAG (SEQ ID NO:20) para aumentar la transcripción cadena abajo de un gen extraño insertado, insertado entre los genes M y F del genoma del virus Sendai.

La presente divulgación contempla un kit que comprende: a) proporcionar: i) un vector del virus Sendai (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento) con o sin adyuvante y ii) instrucciones para su uso para vacunar frente a un patógeno que se tiene como objetivo.

5 La presente divulgación contempla un kit que comprende: a) proporcionar:

i) un vector del virus Sendai con o sin adyuvante y en combinación con otra vacuna; y ii) instrucciones para su uso para vacunar frente a un patógeno que se tiene como objetivo.

10 La presente divulgación contempla un kit que comprende:

a) proporcionar: i) un vector que porta un gen marcador; y ii) instrucciones para su uso para visualizar el virus.

15 En un aspecto, la presente divulgación contempla un vector de virus Sendai recombinante que comprende un vector del virus Sendai modificado en el que se añade una porción del genoma de la cepa Z al genoma de la cepa del virus Enders Sendai para crear una quimera Enders/Z que comprende un gen L modificado, en donde dicho gen L modificado comprende un ácido nucleico que codifica cambios de aminoácidos seleccionados del grupo que comprende de S a G en la posición 155, R a K en la posición 258, G a E en la posición 466, G a E en la posición 482, S a R en la posición 581, Q a R en la posición 717, T a I en la posición 800, R a K en la posición 852, y combinaciones de los mismos.

20 En otros aspectos adicionales, un vector del virus Sendai recombinante divulgado en el presente documento comprende adicionalmente un vector con propiedades inmunogénicas.

25 En otros aspectos, los vectores del virus Sendai recombinantes de Sendai divulgados anteriormente comprenden además tener un gen (o genes) extraño insertado en cualquier posición (o posiciones) incluyendo, pero sin limitación, una o más de una unión intergénica seleccionada del grupo que consiste en una N-P, una P-M, una M-F, una F-HN, una HN-L y combinaciones de las mismas.

30 En aún otros aspectos, el vector recombinante de virus Sendai con un gen extraño en donde dicho gen extraño facilita el rastreo de virus *in vitro*, *in vivo*, o combinaciones de los mismos.

35 En otro aspecto, el vector recombinante de virus Sendai en donde dicho gen extraño para el rastreo se selecciona del grupo de una luciferasa, una proteína verde fluorescente y combinaciones de las mismas.

En aspectos adicionales, los vectores recombinantes de virus Sendai descritos en el presente documento, en donde se manipula al menos un sitio de inicio/parada de genes para alterar la transcripción génica.

40 En otro aspecto, los vectores recombinantes de virus Sendai descritos en el presente documento en donde dicho gen extraño es una proteína F del virus respiratorio sincicial (RSV).

En otros aspectos, se describen en el presente documento vectores recombinantes de virus Sendai en donde dicho gen extraño es una proteína G del virus respiratorio sincicial (RSV).

45 En otros aspectos, se describen en el presente documento vectores recombinantes de virus Sendai en donde dicho gen extraño es una proteína del virus paragripal de tipo 1 (PIV-1).

50 En aún otros aspectos, se describen en el presente documento vectores recombinantes de virus Sendai en donde dicho gen extraño es una proteína del virus paragripal de tipo 2 (PIV-2).

En otros aspectos más, se describen en el presente documento vectores recombinantes de virus Sendai en donde dicho gen extraño es una proteína del virus paragripal de tipo 3 (PIV-3).

55 En otros aspectos más, se describen en el presente documento vectores recombinantes de virus Sendai en donde dicho gen extraño es una proteína del virus paragripal de tipo 4 (PIV-4).

En un aspecto, se describen en el presente documento vectores recombinantes de virus Sendai en donde dicho gen es un gen indicador.

60 En un aspecto, la presente invención contempla un vector de Sendai como se define en el presente documento para su uso en un método de vacunación de un animal frente a una infección.

65 En un aspecto, la presente divulgación contempla una composición que comprende el vector de virus Sendai como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o cualquier vehículo, adyuvante o diluyente.

En un aspecto, el método comprende adicionalmente el vector recombinante de virus Sendai (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento) o la composición descrita en el presente documento, en donde dicho gen extraño se inserta entre un gen P del virus Sendai y un gen M del virus Sendai.

5 En un aspecto, el método comprende adicionalmente el vector recombinante de virus Sendai (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento) o la composición descrita en el presente documento, en donde dicho gen extraño se inserta entre un gen M del virus Sendai y un gen F del virus Sendai.

10 En un aspecto, el método comprende adicionalmente el vector recombinante de virus Sendai (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento) o la composición descrita en el presente documento, en donde dicho gen extraño está insertado entre un gen F del virus Sendai y un gen HN del virus Sendai.

15 En aún otro aspecto, la presente invención contempla un vector recombinante de virus Sendai que comprende un genoma de Sendai de la cepa Enders modificado, con un gen extraño o porción del mismo insertado en medio de una unión intergénica (o uniones intergénicas) seleccionada del grupo que consiste una N-P, una P-M, una M-F, una F-HN, una HN-F y combinaciones de las mismas.

20 En aún otros aspectos, el vector recombinante de virus Sendai comprende adicionalmente un gen extraño, en donde dicho gen exógeno es un gen indicador.

La presente divulgación contempla un kit que comprende: a) proporcionar: i) el vector (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento); y ii) instrucciones para su uso para vacunar frente a un patógeno que se tiene como objetivo.

25 La presente divulgación contempla un kit que comprende: a) proporcionar: i) la composición (es decir, una de las nuevas composiciones descritas en el presente documento); y ii) instrucciones para su uso para vacunar frente a un patógeno que se tiene como objetivo.

30 La presente divulgación contempla un kit que comprende: a) proporcionar: i) el vector (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento); y ii) instrucciones para su uso para visualizar el vector.

La presente divulgación contempla el vector recombinante de virus Sendai (es decir, uno de los nuevos vectores descritos en el presente documento) en donde dicho vector se mezcla con al menos otro antígeno o inmunógeno.

35 En otros aspectos más, los vectores recombinantes de virus Sendai descritos en el presente documento en donde dicho gen extraño es una proteína de metapneumovirus.

40 Adicionalmente, las descripciones de los aspectos presentados no pretenden ser limitantes e incluyen todos los equivalentes, tecnologías comparables, reactivos, fuentes, diluyentes, usos etc. conocidos para un experto en la materia. Solo para ejemplo, pero sin limitación, se presentan secuencias específicas, pero incluyen las relacionadas sentido, las antisentido, las complementarias, las homólogas, porciones, fragmentos, 5' a 3' y 3' a 5', y análogos conocidos por un experto en las materias relacionadas, tales como biología molecular, biotecnología, junto con todas y cada una de las materias relacionadas. Además, aunque se presenta una mención específica del tratamiento de infecciones víricas respiratorias en seres humanos, se contempla que el vector de vacuna jenneriana podría usarse como una estructura para el desarrollo de otras vacunas o procedimientos usados *in vitro* o *in vivo* para diagnosticar o tratar generalmente mamíferos, y más particularmente seres humanos. Por ejemplo, pero sin limitación, el vector de vacuna, contempla el uso en mamíferos no humanos tales como perros, gatos, caballos, ganado vacuno y primates. Además, las vacunas y/o composiciones incluyen opcionalmente diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, pero también incluyen el uso de diluyentes/adyuvantes de tipo para investigación, y/o son sin diluyentes/adyuvantes.

Breve descripción de las figuras

55 El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

60 Dentro de la secuencia presentada en la Figura 7 se pueden encontrar los distintos genes del virus Sendai haciendo una búsqueda en las secuencias. Las secuencias presentadas en la Figura 7B-7H se tomaron directamente de la secuencia del vector de 7A y se presentan de forma individual. Las secuencias proteicas relacionadas se proporcionan dentro de la descripción detallada.

65 **Figura 1. Fenotipos *in vitro* e *in vivo* de virus Sendai que expresan luciferasa. (A)** Se generaron virus Sendai recombinantes que contienen el gen de la luciferasa de luciérnaga (*luc*) insertado en las uniones de los genes P-M, M-F y F-HN. **(B)** Cinética de replicación de múltiples etapas de los SeV de tipo silvestre (TS) y que expresan luciferasa en cultivos de células LLC-MK2 infectados con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 UFP/célula a 33 °C (símbolos rellenos) y 37 °C (símbolos vacíos). **(C)** Cinética de la expresión del gen

indicador de luciferasa en células LLC-MK2 infectadas con los SeV recombinantes a una MOI de 5 UFP/célula, medido por luminiscencia. **(D)** Cambios de peso corporal de los ratones después de la inoculación intranasal de los SeV. **(E)** Porcentaje de supervivencia de los ratones después de la inoculación intranasal de los SeV. **(F)** Números totales de linfocitos recuperados del líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de ratones 10 días después de la infección, medido por citometría de flujo. **(G)** Títulos de anticuerpos de unión específica a SeV en sueros de ratones recogidos 10 días después de la infección, medido por la recíproca de las diluciones límite en ensayos ELISA. Para los paneles **D - G**, se inocularon por vía intranasal grupos de cinco ratones de 8 semanas de edad de la cepa 129/Sv con 7.000 UFP de SeV recombinante o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y, los experimentos se realizaron por duplicado. Los datos acumulados se muestran en los paneles **D y E**, y los datos representativos se muestran en los paneles **F y G**.

Figura 2. Obtención de imágenes de la infección por SeV en las vías respiratorias de ratones vivos por bioluminiscencia no invasiva. Se inocularon ratones de ocho semanas de edad por vía intranasal con 7.000 UFP de SeVc-luc(P-M), SeVc-luc(F-HN) o SeVc-luc(M-F*). Cada 24 horas, se les inyectó a los ratones sustrato de luciferina por vía intraperitoneal, se anestesiaron con isoflurano, se obtuvieron imágenes con un dispositivo Xenogen Lumina y después se dejó que se recuperaran. En un experimento, se muestra la bioluminiscencia en el día 2 **(A)** o en el día 7; **(B)** posinfección (p.i.) para los ratones 129/SvJ infectados con SeVc-luc(P-M)SeVc-luc(P-M), SeVc-luc(F-HN) o SeVc-luc(M-F*). En un segundo experimento, se muestra la bioluminiscencia en el día 2 **(C)** o el día 7 **(D)** para ratones 129/SvJ, DBA/2, BALB/c o C57BL/6 infectados con SeVc-luc(M-F*). Los datos se presentan como radiación, una medida de intensidad de bioluminiscencia, en una escala logarítmica de arco iris. Los valores de radiación van de 1×10^6 (azul) a 1×10^9 (rojo) fotones/s/cm²/estereorradián. Los círculos rojos muestran las regiones de interés (RDI) para calcular el flujo total (fotones/s) en la nasofaringe y los rectángulos rojos muestran las áreas de RDI para la tráquea y los pulmones.

Figura 3. Cinética de la propagación y eliminación del SeV en las vías respiratorias de ratones 129/Sv. **(A)** Los grados de infección se determinaron mediante la obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva cada 24 horas de ratones vivos anestesiados. Cada punto de datos representa la bioluminiscencia promedio de 6 ratones. El flujo total (fotones/s) de la intensidad de bioluminiscencia se calcula como la suma de la radiación en la región de interés. **(B - D)**. Los grados de replicación del virus en los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones se determinaron sacrificando grupos de 3 ratones en los días informados y midiendo los títulos de virus infeccioso en células LLC-MK2. Ambos experimentos se hicieron por duplicado y se muestran datos representativos.

Figura 4. Replicación del virus y patogenia en función de la dosis del virus y de la cepa del ratón. Después de la inoculación intranasal de ratones de la cepa 129 con SeVc-luc(M-F*) en dosis que varían de 70 a 7.000 PFU, se midieron el flujo total de intensidades de bioluminiscencia **(A)** y los títulos víricos **(B)** como se describe en la Figura 3. **(F)** Se midieron los porcentajes de cambio de peso corporal para grupos de diez ratones después de la infección con 70 o 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) de ratones de la cepa 129. Los experimentos se hicieron por duplicado y se muestran datos representativos. **(D)** Se recogieron títulos de anticuerpos de unión específica a SeV en sueros de ratones de la cepa 129 10 días después de la inoculación con 70 a 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) y se informaron como las recíprocas de las diluciones límite en ensayos ELISA. Se usaron en el experimento, que se realizó dos veces, cinco ratones infectados y dos de control. Se muestran los datos representativos. **(E)** Flujo total de intensidades de bioluminiscencia presentes en la nasofaringe, la tráquea y los pulmones después de la inoculación intranasal de 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) de ratones de las cepas 129-Sv, DBA/2, BALB/c o C57BL/6. Los promedios son para seis animales, el experimento se hizo por duplicado y se muestran los resultados de un experimento representativo. **(F)** Se midieron los porcentajes de cambio de peso corporal para grupos de 10 ratones después de la infección con 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*). Los experimentos se hicieron por duplicado y se muestran datos representativos.

Figura 5. Infección por SeV e inmunidad después de la transmisión por contacto. Un ratón por jaula se inoculó de forma directa con 70 UFP **(A,C,E)** o 7.000 UFP **(B,D,F)** de SeVc-luc(M-F*) y después de un día se introdujeron en una jaula con 3 animales sin tratamiento previo. Se muestra el flujo total de intensidades de bioluminiscencia en las cavidades nasofaríngeas de los ratones de la cepa 129 **(A - B)** y la cepa BALB/c **(C - D)**. Se recogió suero en el día 60 y los ratones de contacto se expusieron a 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) el día 63, de forma que la posible reinfección podía controlarse mediante bioluminiscencia. Se midieron los títulos de anticuerpos de unión específicas a SeV como las recíprocas de las diluciones de límite de los sueros recogidos en el día 60 a partir de ratones alojados de forma conjunta con animales inoculados con 70 UFP **(E)** o 7.000 UFP **(F)**. Las barras vacías corresponden a los ratones inoculados de forma directa en el día 0 y las barras rellenas corresponden a los ratones de contacto. El experimento se realizó por triplicado para los ratones de la cepa 129 (3 animales donantes y 9 transmitidos) y por duplicado para los ratones de la cepa BALB/c (2 animales donantes y 6 transmitidos).

Figura 6. Temporización y propagación con tropismo de tejido de la infección por SeV después de la transmisión de contacto. El alojamiento conjunto de ratones de contacto con ratones inoculados con SeVc-luc(M-F*) se describe en la Figura 5. Se muestra el flujo total de intensidades de bioluminiscencia ratones representativos individuales de la cepa 129 **(A - B)** y de la cepa BALB/c **(C - D)** para la nasofaringe (triángulos),

tráquea (círculos) y pulmones (cuadrados). Tiempo hasta la detección de bioluminiscencia en la nasofaringe (límite de detección: $> 6 \log_{10}$ fotones/s) después de la inoculación de donantes con 70 UFP (**E**) o 7.000 UFP (**F**). Cambio de peso porcentual promedio en ratones BALB/c (**G**) y 129/SvJ (**H**). El experimento de transmisión por contacto se realizó por triplicado para los ratones 129/SvJ y por duplicado para los ratones BALB/c. Los símbolos y barras vacíos corresponden a ratones inoculados de forma directa y los símbolos y barras rellenos corresponden a los ratones de contacto. En los paneles g y h, el símbolo X corresponde a ratones de control inoculados con PBS no infectados.

Figura 7. Listado de secuencias. La FIG. 7A-H es como sigue: **A**, Se proporciona la secuencia de una construcción de un SeV modificado (pSeVc) (véase también la Tabla 1) y las secuencias de los genes del virus Sendai individuales; **B**, ADNc de NP: (SEQ ID NO:4); **C**, ADNc de P: (SEQ ID NO:6); **D**, ADNc de C (SEQ ID NO:8); **E**, ADNc de M: (SEQ ID NO:10); **F**, ADNc de F (SEQ ID NO:12); **G**, ADNc de HN (SEQ ID NO:14); y **H**, ADNc de L (SEQ ID NO:16). Las traducciones asociadas se muestran en la descripción detallada. Las secuencias se enumeran de 5' a 3' (de izquierda a derecha). Las leyendas de las figuras son las siguientes: Leyendas de la secuencia para los genes dentro del plásmido pSeVc

= Codón iniciador
 = Codón de terminación
Violeta= Secuencia del gen NP
Púrpura= Secuencia del gen P
PÚRPURA EN MAYÚSCULAS = secuencia del gen C (sitio de iniciación interno dentro del gen P)
naranja = secuencia del gen M
Azul oscuro= Secuencia del gen F
Rosa = Secuencia del gen NH
Negro intenso = Secuencia del gen L

Agggtgaaag

= Señal de iniciación de la transcripción

Gcggccgc

= NotI (para la clonación del gen de interés, por ejemplo hPIV-2)

Figura 8 Ejemplos de sitios en los cuales se pueden insertar genes extraños en el genoma del vector del virus Sendai. Los sitios de inserción pueden incluir, pero sin limitación, posiciones cadena arriba de los genes P, M, F y HN. Los casetes de genes extraños están flanqueados por sitios para la endonucleasa de restricción NotI y los plásmidos de ADNc del vector del virus Sendai se han diseñado técnicamente para tener sitios para la endonucleasa de restricción NotI únicos cadena arriba de los diversos genes del virus Sendai.

Figura 9. Construcción de virus Sendai que expresan luciferasa. (A) Secuencia de nucleótidos del casete del gen de la luciferasa de luciérnaga. Se diseñó técnicamente un plásmido de clonación pGEM3 para que contenga sitios de restricción NotI flanqueantes, el gen indicador luciferasa de luciérnaga, secuencias de finalización génicas y de iniciación génicas. **(B)** Para insertar el casete del gen indicador de luciferasa en tres uniones génicas, se clonaron tres plásmidos del genoma del pSeV para que contengan un sitio de restricción NotI único en cada una de las uniones génicas P-M, M-F y F-HN. Para el plásmido del genoma pSeV-luc(M-F*), la señal de iniciación subóptima de origen natural AGGGATAAAG (SEQ ID NO: 19) se mutó además a la señal de iniciación más eficaz AGGGTGAAAG (SEQ ID NO: 20) para compensar la atenuación esperada debida a la adición del gen extraño y la unión génica adicional. El casete del gen de la luciferasa de luciérnaga (panel A) se subclonó a partir del plásmido pGEM3 en los plásmidos del genoma de pSeV usando los sitios de restricción NotI. **(C)** Diseño de plásmidos de ADNc de pSeV para el rescate de los SeV de TS y recombinantes que contienen el gen indicador luciferasa (luc). Se muestran los emplazamientos de los genes del SeV nucleoproteína (N), polimerasa (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína Large (grande) (L), así como el promotor de la ARN polimerasa de T7 (T7) y la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (ribo). Las secuencias de iniciación génicas se muestran en verde y la secuencia de iniciación génica de origen natural subóptima AGGGATAAAG (SEQ ID NO: 19) entre los genes M y F del SeV de TS se muestra en amarillo. Las secuencias de finalización génicas se muestran en rojo. La secuencia líder 3' cadena arriba del gen N y la secuencia remolque 5' cadena abajo del gen L no se muestran por simplicidad.

Figura 10. Expresión de proteínas del SeV e incorporación en viriones. (A) Expresión de proteínas del SeV en células LLC-MK2. Se infectaron monocapas confluentes de células LLC-MK2 con los SeV recombinantes a una MOI de 5 UFP/célula y se incubaron durante 16 h. Después del radiomarcaje y la inmunoprecipitación, las proteínas víricas presentes en los lisados se resolvieron mediante SDS-PAGE y se visualizaron con un phosphorimager. **(B)** Relaciones de la expresión de proteínas del SeV. La expresión de proteínas se cuantificó con el programa informático ImageQuant® 5.2 y se normalizó con respecto al nivel de expresión de la proteína N. Los datos representan los promedios (+/- desviación típica) de tres experimentos. **(C)** Composición del SeV. Los SeV recombinantes se recogieron a partir de las cavidades alantoideas de huevos de gallina embrionados, se

purificaron por centrifugación a través de un gradiente de sacarosa, se separaron por SDS-PAGE y se visualizaron con azul de Coomassie.

Figura 11. Respuestas inmunológicas frente a la infección por los SeV recombinantes en ratones. Se inocularon por vía intranasal grupos de cinco ratones 129/SvJ de 8 semanas de edad con 30 μ l que contenían 7.000 UFP de SeV recombinante o PBS. En el día 10 p.i., se recogió el suero y los ratones se sacrificaron para recuperar líquido de lavado broncoalveolar (LLBA). Los experimentos se realizaron dos veces con los datos representativos mostrados. Cada punto de datos representa un animal individual y las barras horizontales muestran los promedios de grupo. La cantidad de linfocitos T CD4+ (**A**) y CD8+ (**B**) recuperadas a partir del LLBA se determinaron mediante citometría de flujo. (**C**) Los títulos de anticuerpos de unión específica luciferasa en los sueros se determinaron mediante ensayos ELISA y se expresan como la recíproca de las diluciones límite.

Figura 12. Bioluminiscencia y títulos del virus Sendai en las vías respiratorias de ratones 129/SvJ. Se inocularon por vía intranasal grupos de tres ratones de 8 semanas de edad con 7.000 UFP de SeV recombinante. (**A**) Se midió la bioluminiscencia *in vivo* para los tres virus que expresan luciferasa en los días 4 y 6 p.i., después de lo cual los pulmones se recogieron inmediatamente y se homogeneizaron de forma que se pudiera medir la actividad de luciferasa *ex vivo*. Un ajuste de los datos con un modelo de regresión lineal de mínimos cuadrados produjo un valor de R^2 de 0,878. URL indica unidades relativas de luz. (**B**) Comparación entre la luz detectada por la cámara y los títulos víricos de los homogenatos de nasofaringe (triángulos), tráquea (círculos) y pulmones (cuadrados). Cada punto representa datos de un único ratón infectado con SeVc-luc(M-F*) y estudiados en los días 2, 3, 5 o 7 p.i. La regresión lineal de mínimos cuadrados produjo valores de R^2 de 0,864, 0,915 y 0,961 para la nasofaringe, la tráquea y los pulmones, respectivamente.

Figura 13. Bioluminiscencia y títulos del virus Sendai en las vías respiratorias de ratones BALB/c y 129/SvJ. Se inocularon por vía intranasal grupos de tres ratones de 8 semanas de edad con 70 o 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*). (**A**) Se midió la bioluminiscencia *in vivo* en ratones BALB/c infectados con 7.000 UFP de virus, en los días 2, 3, 5 y 7 p.i., después de lo cual los animales se sacrificaron y los tejidos se recogieron de forma que se pudieran medir los títulos de virus de los homogenatos de tejidos mediante titulación por placas en células LLC-MK2. Se encontró que las correlaciones entre los títulos de virus en los homogenatos de tejido y la luz detectada por la cámara tenían valores de R^2 de 0,928, 0,656 y 0,846 para la nasofaringe, la tráquea y los pulmones, respectivamente. Los títulos de virus en los homogenatos de la nasofaringe (**B**) y pulmones (**C**) de ratones de las cepas BALB/c y 129 infectados con 70 o 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) se midieron mediante titulación por placas en células LLC-MK2. Los datos representan los títulos promedio de virus de seis ratones (+/- desviación típica).

Figura 14. Temporización específica de tejidos y magnitud de la propagación del virus Sendai en las vías respiratorias de ratones intactos después de la inoculación y la transmisión por contacto. En cada grupo, se inoculó un ratón BALB/c o 129/SvJ por vía intranasal con 70 o 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) y se coalojaron con tres animales de contacto un día después, como se describe en la Figura 5. (**A-D**) Tiempo hasta la detección de bioluminiscencia en la nasofaringe (nasof.), tráquea y pulmones (límite de detección: $> 6 \log_{10}$ fotones/s) después de la inoculación directa (barras vacías) y después de la transmisión por contacto (barras rellenas). (**E-H**) Magnitud global de la infección después de la inoculación directa (barras vacías) y después de la transmisión por contacto (barras rellenas), determinado por la integración de las mediciones diarias del flujo total con respecto al tiempo. Las áreas bajo la curva (ABC) de bioluminiscencia se expresan como la cantidad total de fotones en una escala \log_{10} . El experimento se realizó por triplicado para los ratones de la cepa 129 (3 animales donantes y 9 transmitidos) y por duplicado para los ratones de la cepa BALB/c (2 animales donantes y 6 transmitidos).

Figura 15. Diagrama de construcción PSEV. El ADNc de la cepa Enders del virus Sendai se clonó en el vector pUC, que contenía un promotor de T7 cadena arriba y una secuencia de ARN de autoescisión de VHD cadena abajo.

Figura 16. Persistencia en primates de la vacuna de la cepa Z y las vacunas basadas en Enders después de la inoculación intranasal e intratraqueal. Se inocularon monos verdes africanos con la vacuna del virus Sendai Z (**A** y **B** (Skiadopoulos *et al.* 2002 *Virology* 297: 153)) o con vacunas basadas en Sendai virus Enders (**C** y **D**) por vía intranasal e intratraqueal. Las cargas de virus se controlaron en las VRS o las VRI después de las infecciones.

Figura 17. Inmunogenicidad del virus Sendai Enders no modificado y de una vacuna basada en el virus Sendai Enders modificado recombinante que expresaba F del RSV (SeVc-RSVF(F-HN)) en monos verdes africanos. 25 días después de las vacunaciones se tomaron sueros y se analizaron mediante ELISA las respuestas de anticuerpos frente a F del RSV (**A**) y al virus Sendai (**B**).

Figura 18. La vacuna basada en virus Sendai Enders modificado que expresaba F del RSV protege a los primates del RSV. Los animales de control (izquierda, **A**) y de prueba (derecha, **B**) se expusieron a RSV aproximadamente 1 mes después de la vacunación. Se recogieron muestras de lavado broncoalveolar (LBA)

durante 10 días después de la exposición y se evaluó el crecimiento del RSV. Todos los animales que recibieron la vacuna basada en virus Sendai Enders modificada que expresaba F del RSV (SeVc-RSVF(F-HN)) estaban protegidos frente a la infección de las vías respiratorias inferiores por RSV.

5 **Figura 19. La vacuna basada en virus Sendai Enders modificado que expresaba F del RSV (SeVc-RSVF(F-HN)) es protectora frente al RSV a dosis bajas.** La vacuna basada en virus Sendai Enders modificado que expresaba F del RSV se usó para vacunar animales a dosis de 10e6, 10e4 y 10e2. Todos los animales vacunados estaban protegieron frente a la exposición al RSV, como se demostró midiendo el virus en pulmón después de la exposición.

10

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, se definen a continuación una serie de términos (entre comillas en la presente sección de Definiciones). Los términos definidos en el presente documento (a menos que se especifique otra cosa) tienen los significados que entiendo habitualmente un experto en las áreas relevantes para la presente invención.

15

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al que pueden administrarse las composiciones de acuerdo con la invención, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos; insectos; gusanos; etc.). Además se pueden usar sistemas *in vitro* (por ejemplo, para expresar proteínas del SeV u otras, para el estudio dentro de la célula diana y/o para el aislamiento). Por ejemplo, solo se contemplan, pero sin limitación, células LLC-MK2 en cultivo (véase la Figura 1).

20

25

Como se usa en el presente documento, El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la modificación de la reactividad del sistema inmunitario de un organismo tras la exposición a un antígeno. El término "respuesta inmunitaria" abarca, pero sin limitación, una o ambas de las siguientes respuestas: producción de anticuerpos (por ejemplo, inmunidad humoral) e inducción de la inmunidad mediada por células (por ejemplo, inmunidad celular, que incluye las respuestas de linfocitos T auxiliares y/o de linfocitos T citotóxicos).

30

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural (por ejemplo, como en una digestión con enzimas de restricción purificada), ya sea se produzca de forma sintética, que tenga la capacidad de actuar como punto de iniciación de la síntesis de un ácido nucleico cuando se coloque en condiciones en las cuales se induzca la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos, un agente inductor tal como ADN polimerasa y en condiciones adecuadas de temperatura y pH). El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero como alternativa puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata en primer lugar para separar sus cadenas antes de usarse para preparar productos de extensión. En realizaciones preferentes, el cebador está unido al extremo de un ácido nucleico de forma que se forma una horquilla a partir de autohibridación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo como para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, fuente del cebador y el uso del método. Además se contempla que los cebadores se puedan usar en PCR (ver a continuación) para insertar de forma artificial secuencias de nucleótidos deseadas en los extremos de las secuencias de ácidos nucleicos.

35

40

45

Como se usa en el presente documento, la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") se refiere al método de K. B. Mullis, Patentes de Estados Unidos 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, que describen un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN sin clonación o purificación. Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se vuelven las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que son "amplificados por PCR". De manera similar, la expresión "PCR modificada", como se usa en el presente documento, se refiere a métodos de amplificación en que una secuencia de ARN se amplifica a partir de un molde de ADN en presencia de ARN polimerasa o en que se amplifica una secuencia de ADN a partir de un molde de ARN en presencia de transcriptasa inversa.

50

55

Como se usa en el presente documento, las expresiones "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

60

Los términos "antígeno", "antigénico", y "antigénicamente activo", se refieren a cualquier sustancia que pueda ser reconocida por una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica. Las expresiones "inmunógeno", "inmunogénico" e "inmunológicamente activo" se refieren a cualquier sustancia que tenga la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular específica. Un antígeno o inmunógeno en general contiene al menos un epítipo. Los antígenos e inmunógenos están ejemplificados por, aunque sin limitación, moléculas, que contienen un péptido, un polisacárido, una secuencia de ácidos nucleicos y/o un lípido. Además se contemplan complejos de

65

péptidos con lípidos, polisacáridos o con secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo (pero sin limitación) un glucopéptido, lipopéptido, glucolípido, etc. Estos complejos son inmunógenos particularmente útiles en que las moléculas más pequeñas con pocos epítomos no estimulan por sí mismas una respuesta inmunitaria satisfactoria.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un oligonucleótido, un nucleótido o un polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y viceversa, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que puede ser de monocatenario o bicatenario, y representa la cadena sentido o antisentido. De manera similar, "secuencia de aminoácidos", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia peptídica o de proteína.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "antisentido", cuando se usa en referencia al ADN, se refiere a una secuencia que es complementaria con una cadena sentido de un dúplex de ADN. Una "cadena sentido" de un dúplex de ADN se refiere a una cadena en un dúplex de ADN que se transcribe en una célula en su estado natural en un "ARNm sentido". Por lo tanto, una secuencia "antisentido" es una secuencia que tiene la misma secuencia que la cadena no antisentido en un dúplex de ADN.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, para la secuencia "5'-A-G-T-3'", es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'". La complementariedad puede ser "parcial", en que solo parte de las bases de ácido nucleico se combinan de acuerdo con las reglas del emparejamiento de bases. O puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

20 El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que inhibe al menos parcialmente la hibridación de una molécula de ácido nucleico completamente complementaria con un ácido nucleico diana que es "sustancialmente homólogo". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana se puede examinar usando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga a una diana, en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede analizar mediante el uso de una segunda diana que sea sustancialmente no complementaria (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30 % de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará con la segunda diana no complementaria.

30 Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una composición inmunogénica que se administra a un hospedador para proporcionar algún grado de protección frente a una infección y/o enfermedad producida por virus o patógeno diana. Además, cierto grado de protección incluye, pero sin limitación, disminuir, reducir, modificar y/o mejorar uno o más síntomas de una infección y/o enfermedad. En general, algunos síntomas de enfermedades respiratorias incluyen síntomas de resfriado y de forma más particular, por ejemplo, pero sin limitación, disnea o dificultad para respirar, tos, fiebre, tos perruna (a menudo descrita como tos de "ladrido de foca"), cianosis (color azulado de la piel debido a la falta de oxígeno), aleteo nasal, congestión nasal, nariz sibilante, congestionada y/o rinitis. Además, las enfermedades respiratorias pueden afectar los pulmones, provocando bronquiolitis o pulmonía. Dicha composición podría incluir un diluyente y/o vehículo "farmacéuticamente aceptable" o cualquier vehículo, adyuvante o diluyente. Por ejemplo, pero sin limitación, se pueden encontrar diluyentes y/o vehículos aceptables en "The Science and Practice of Pharmacy" de Remington, 21ª ed. 2005. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcionado con una relación beneficio/riesgo razonable. Los expertos en la materia conocen numerosas formulaciones de vacuna.

40 Las vacunas se pueden administrar solas o en combinación con diversos adyuvantes/vehículos. Los expertos en la materia conocen vehículos farmacéuticos. Estos, más normalmente, serían vehículos convencionales para la administración de vacunas a seres humanos, que incluyen soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Otros ingredientes incluyen excipientes, vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes y tensioactivos.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "administración" y "administrar" se usan indistintamente e incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, administración por aerosol, gotitas, inyección parenteral (tal como intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), intranasal a través de gotitas, inhalación, etc. Véase "The Science and

Practice of Pharmacy" de Remington, 21ª ed. 2005.

Como se usa en el presente documento, la expresión "virus Sendai" es un virus paragripal de ratón que es el homólogo murino del hPIV-1.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "gen indicador" incluye un medio para facilitar el rastreo del virus. Solo para ejemplo, pero sin limitación, el gen indicador, como se describe en el presente documento, incluye luciferasa, proteína verde fluorescente, proteína roja fluorescente, junto con otros medios de rastreo visual (por ejemplo, con sondas o anticuerpos marcados), como conocen los expertos en la materia. Además, aunque se proporcionan ejemplos específicos, la presente invención contempla otros medios de proteínas indicadoras fluorescentes, bioluminiscentes, luminiscentes y relacionadas útiles para el rastreo.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula que tenga la capacidad de replicar y/o transcribir, y/o traducir un gen heterólogo. Por lo tanto, una "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula eucariota o procariota (por ejemplo, tales como células LLC-MK2 (véase la Figura 1), células bacterianas, *E. coli*, células de levadura, células de mamífero, células de ave, células de anfibio, células vegetales, células de pez y células de insecto), ya sea emplazadas *in vitro* o *in vivo*.

20 Como se usa en el presente documento la expresión "de tipo silvestre", cuando hace referencia a un gen, se refiere a un gen que tiene las características de un gen aislado de una fuente de origen natural. La expresión "de tipo silvestre", cuando hace referencia a un producto génico, se refiere a un producto génico que tiene las características de un producto génico aislado de una fuente de origen natural. La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo a los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el ser humano en el laboratorio es de origen natural. Un gen de tipo silvestre es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen.

30 Por el contrario, el término "modificado" o "mutante" cuando hace referencia a un gen o a un producto génico se refieren, respectivamente, a un gen o a un producto génico que presenta modificaciones en la secuencia y/o las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen o producto génico de tipo silvestre. se debe señalar que los mutantes de origen natural se pueden aislar; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas en comparación con el gen o producto génico de tipo silvestre.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "un Enders modificado" significa un genoma de la cepa Enders del virus Sendai que comprende una porción de un genoma de la cepa Z del virus Sendai.

40 Como se usa en el presente documento, una "quimera" significa un genoma de la cepa Enders del virus de Sendai que contiene una o más porciones de un genoma de una cepa de virus Sendai distinta una combinación operativa. Más particularmente, solo para ejemplo (pero sin limitación), en una realización, la presente invención contempla un genoma de la cepa de virus Enders del Sendai que comprende una o más porciones de un genoma de la cepa Z del virus Sendai.

45 Como se usa en el presente documento, el término "purificado" se refiere a moléculas, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, que se retiran de su entorno natural, aisladas o separadas. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" es, por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico purificada. Las moléculas "sustancialmente purificadas" están al menos el 60 % libres, preferentemente al menos el 75 % libres y muy preferentemente al menos el 90 % libres de otros componentes con los que están asociadas de forma natural.

50 Como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" también se refiere a la eliminación de contaminantes de una muestra. La eliminación de proteínas contaminantes da como resultado un aumento en el porcentaje del polipéptido de interés en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células hospedadoras vegetales, bacterianas, levaduras o de mamífero, se purifican mediante la eliminación de las proteínas de la célula hospedadora; de ese modo, el porcentaje de polipéptidos recombinantes aumenta en la muestra.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "*in vitro*" se refiere a sucesos que se producen en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "*in vivo*" se refiere a sucesos que se producen dentro de un organismo multicelular. Solo para ejemplo, pero sin limitación, tal como un mamífero, más particularmente un animal humano y/o no humano.

65 Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, de ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN

(por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante, siempre que la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, inmunogenicidad, etc.) de la secuencia de longitud completa o fragmento se mantengan. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias emplazadas de forma a la región codificante en los extremos 5' y 3' en cada extremo, de forma que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias emplazadas 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias emplazadas 3' o cadena abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto las formas de ADNc como genómicas de un gen. Una forma o clon genómico de un gen contiene la región codificante interrumpida por secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias", o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe en ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "cortan y empalman" a partir del transcrito nuclear o primario; por lo tanto, los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción especificando la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, el término "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo de un organismo que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, añadido en múltiples copias, anido a secuencias regulatorias no nativas, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias de los genes heterólogos normalmente están unidas a secuencias de ADN que no se encuentran asociadas de forma natural con las secuencias génicas del cromosoma o están asociadas con porciones del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en locus donde el gen no se expresa normalmente).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "en combinación operativa", "en orden operativo" y "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de secuencias de ácido nucleico de tal manera que se produce una molécula de ácido nucleico que tiene la capacidad de dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. Las expresiones también se refieren a la unión de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce una proteína funcional.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo celular" se refiere a cualquier cultivo de células *in vitro*. Se incluyen dentro de esta expresión líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas) y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "multiplicidad de infección (MOI, forma siglada de *multiplicity of infection*)" se refiere a la relación de partículas de virus infecciosas con respecto a las células diana (es decir, la relación de partículas de virus infecciosas depositadas en un pocillo, con respecto al número de células diana en ese pocillo).

Como se usa en el presente documento, la expresión "unidades formadoras de placa (UFP)" se refiere a una medida del número de partículas de virus capaces de infectar células y, en consecuencia, de formar placas en una monocapa de células diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye dentro de su significado una cantidad no tóxica pero suficiente de un agente o compuesto como para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la especie que se esté tratando, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el agente particular a administrar y el modo de administración, etc. Por lo tanto, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, en cualquier caso, un experto en la materia puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada usando únicamente experimentación rutinaria.

Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. En el contexto de los ensayos de reacción, tales sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, oligonucleótidos, enzimas, etc. en los recipientes apropiados) y/o de materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo, etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más envases (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o los materiales de soporte relevantes. Como se usa en el presente documento, el término "kit fragmentado" se refiere a sistemas de suministro que comprenden dos o más recipientes separados que contienen cada uno una parte del total de componentes del kit. Los recipientes pueden suministrarse al destinatario previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene oligonucleótidos. El término "kit fragmentado" está destinado a abarcar kits que contienen reactivos específicos de análisis (ASR, forma siglada de *analyte specific reagents*) regulados en la sección 520 (e) la Ley federal de alimentos, fármacos y cosméticos, pero sin limitación. De hecho, se incluye en la expresión "kit fragmentado" cualquier sistema de suministro que comprenda dos o más

recipientes separados, conteniendo cada uno una parte de los componentes totales del kit. Por el contrario, un "kit combinado" se refiere a un sistema de suministro que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un único recipiente (por ejemplo, en una única caja que aloja cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye kits fragmentados y combinados.

5 Como se usa en el presente documento, el término SeVc se refiere a cualquier construcción basada en la estructura de SeVc descrita a continuación. Por ejemplo, pero sin limitación, un aspecto es un SeVc-luc(M-F*), que indica una construcción de SeVc modificada que contiene un gen indicador de luciferasa clonado en la unión génica M-F. Véase la Tabla 1.

10 Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a vectores de virus recombinantes, a métodos para construir vectores y al uso de tales vectores. La presente divulgación proporciona métodos, construcciones de virus recombinantes y composiciones, y kits para un vector de virus Sendai modificado para la protección frente a patógenos. Además, algunos aspectos incluyen vectores para obtener imágenes o rastrear la propagación, la eliminación y la transmisión víricas. En un aspecto, la presente invención contempla un nuevo vector de vacuna de virus Sendai recombinante con los siguientes atributos: (i) capacidad de rescate fácil de vectores recombinantes mediante genética inversa, (ii) capacidad de portar un gen marcador para el rastreo de *in vivo* e *in vitro*, (iii) sustento de la expresión e inmunogenicidad de una proteína (o proteínas) extraña cuando el gen (o genes) respectivo se introduce en distintas posiciones dentro del genoma de SeV, (iv) crecimiento limitado en primates, (v) suficiente capacidad de replicación para sustentar inmunogenicidad en primates. Además, algunos aspectos también proporcionan un atributo de (vi) crecimiento limitado a 33 °C e incluso menor crecimiento a 37 °C. La presente divulgación presenta un equilibrio inesperado de atenuación del vector del virus, crecimiento del vector del virus, expresión de genes exógenos e inmunogenicidad para mantener cada uno de estos atributos deseados.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un vector que es inesperadamente superior a otros vectores de SeV, que incluyen cepas Enders o Z no modificadas, porque se puede rescatar fácilmente y presenta tanto atenuación como inmunogenicidad en primates. Los métodos, las construcciones y formulaciones de virus recombinantes y los kits, facilitarán el uso de este vector de virus Sendai como herramienta de laboratorio o en un contexto de investigación preclínica/clínica.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un virus Sendai modificado, que puede usarse como vacuna. Para crear virus recombinantes puede usarse un plásmido que contenga el genoma completo del virus Sendai, flanqueado por un promotor de T7 y la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta. Véase la Figura 8 para ver ejemplos de cuatro posiciones intergénicas en las cuales se pueden colocar genes extraños antes del rescate del virus (Brown *et al.* J. Virology, 2007, 81: 12535).

A continuación están las secuencias de un gen F del RSV, las secuencias proteicas para los distintos genes del virus Sendai como se presentan en un construcción del virus Sendai modificado (pSeVc) y una secuencia para el recombinante pSeVc que porta el inserto del gen de F del RSV en la posición F-HN del genoma del virus Sendai (pSeVc-RSVF(F-HN)). Se muestran también las traducciones asociadas. Todas las secuencias se enumeran de 5' a 3' (de izquierda a derecha). (Para las secuencias véase también la Figura 7).

45 **Secuencia del gen de F del RSV (inserto a partir de la construcción genómica) (SEQ ID NO: 1)**

atggagttgctaactcctcaagcaaagcaattaccacaactcctcactgcaagcattttgttttctctggtcAAAACATCACTGAAGAATTT
atcaatcaacatgcagtgcaaggaagctatctagtgctctgagaactggttgatatacagtggtataactatagaattaagtaatatca
agaaaaataagtgtaattggaacagatgccaaggcaaaattgataaaacaagaattagataatataaaaatgctgtaacagaattgcagttgc
tcatgcaaaacacacaagcaacaacaatcagccagaagagaactaccaagggttatgaattatacactcaacaatgccccaaaaaacaa
tgaacattaagcaagaaaaagaaaagatttcttggtttttgtaggtggtgatctgcaatgccagtggtgctgtatctaaggtcct
gcacftagaaggggaagtgaacaagatcaaaagtgcctactatccacaacaaggctgtagtcagcttatcaaatggagttagtgcttaac
cagcaaaagtgttagacctcaaaaactatatagataaacaattgtacctattgtgaacaagcaagctgcagcatatcaaatatagaactgtg
atagagttccaacaaaaaacaacagactactagagattaccagggaatttagtgtaaatgcaggtgtaactacacctgtaagcacttacatgt
taactaatagtgaattattgctattaatcaatgatagcctatacaaatgatcagaaaaagtaattgccacaatgttcaaatagttagacagca
aagttactctatcatgccataataaaagagggaagtcttagcatatgtagtacaattaccactatattggtgttatggatacacctgttgaaact
acacacatccccctctatgtacaaccaacacaaaaagagggtccaactctgttaacaagaactgacagaggatggtactgtgacaatgcag
gatcagtatctttctccacaagctgaaacatgtaaagtcaatcaaatcagatattttgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaa
taaactctgcaatgtgacatattcaacccccaaatgattgtaaaattatgacctcaaaaacagatgtaagcagctccgttatcacatcttag
gagccattgtgctatgctatgcaaaaactaaatgtacagcatccaataaaaatcgtggaatcataaagacattttctaacgggtgctgattatgta
tcaataaaaggggtggacactgtgctgtgtaggtaaacattatattatgtaataagcaagaggtaaaagtctctatgtaaaagggtgaacaa
taataaattctatgaccattagtagtccccctctgatgaattgatgcataatctcaagtcacgagaagattaaccagagcctagcattatt
cgtaaatccgatgaattattacataatgaattgctggtgaaatccaccacaaatATCATGATAACTACTATAATTatagtgat
tatagtaattgttatcattattgctgttgactgctcttatactgtaaggccagaagcacaccagtcacactaagcaaatcaactgagtg
gtataaataatattgcatttagtaactaa

secuencia de traducción de F del RSV (SEQ ID NO: 2)

MELLILKANAIITILTAVTFASFQGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKKKNCNGTDAKAKLIKQELD
KYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARELPRFMNYTLNNAKKNVTLSSKRRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGE
VNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTP
VSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQSYSIMSIKKEVLAYVVQLPLYGVMDTPCWKLHTSP
LCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSK
TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDVYSNKGVDTVSVGNTRYVYVKNQEGKSLYVKGPIINFYDP
LVFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELLHNVIAKSTTNIMITIIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLS
5 KDQLSGINNIAFSN.

secuencia de la proteína NP: (SEQ ID NO:5)

MAGLLSTFDTFSSRRSEINKSGGGAVIPGQRSTVSFVFLGPSVTDDADKLF IATTF LAHSLDLDKQHSQRGGFLVSLLAM
AYSSPELYLTNNGVNADVKYVIYNIKDPKRTKTDGFIKTRDMEYERTTEWLF GPMVKNKSPLEFQQQRDAADPDLLQTYG
YPACLGAIIVQVWIVLVKAITSSAGLRKGFNRLEAFRQDGTVKALVFTGETVEGIGSVMSRQQSLVSLMVETLVTMNTA
10 RSDLTTLEKNIQIVGNIRDAGLASFMMNTIKYGVETKMAALTLNLRPDINKIRSLIDTYLSKGPRAFFICILKDPVHGEF
APGNYPALWSYAMGVAVVQNKAMQQYVTGRTYLDMEMFLLGQAVAKDAESKISSALEDELGVTDTAKERLRHHLANLSSGD
GAYHKPTGGGAI EVALDNADIDLE TEAHADQDARGWGGESGERWARQVSGGHFVTLHGAERLEETNDEDVSDIERRIAMR
LAERRQEDSATHGDEGRNNGVDHDEDDTA AVAGIGGI

secuencia de la proteína P: (SEQ ID NO:7)

MDQDAFILKEDSEVEREAPGGRESLSDVIGFLDAVLSSEPTDIGDRSWLHNTINTPQPGSAHRAKSEGEVSTPSTQD
NRSGEESRVSGRTSKPEAEAHAGNLKQNIHRAFGGRTGTNSVSQDLGDGGDSGILENPPNERGYPRSGIEDENREMAAHP
DKRGEDQAEGLPEEVRGGTSLPDEGEGGASNNGRSMPEGSSHSARVTGVLVIPSPLEEAVALRRNKRRTNSGSKPLTPAT
VPGTRSPPLNRYNSTGSPGKPPSTQDEHINSGDTPAVRVKDRKPPIGTRSVSDCPANGRPIHPGLETDSTKKGIGENTSS
MKEMATLLTSLGVIQSAQEFESSRDASYVFARRALKSANYAEMTFNVCGLLLSAEKSSARKVDENKQLLQIQESVESFRD
15 IYKRFSEYQKEQNSLLMSNLSTLHIITDRGGKTDNTDSLTRSPSVFAKSKENKTKATRFDPSPMETLEDMKYKPDLIREFEF
RDEIRNPVYQERDTEPRASNARLLPSKEKPTMHSRLRVI ESSPLSRAEKAAYVKSLSKCKTDQEVKAVMELVEEDIESLT
N

secuencia de la proteína C (SEQ ID NO:9)

MPSFLKKILKLRGRRQEEESRSRMLSDSSMLSCRVNQLTSEGTEAGSTTPSTLPKDQALPIEPKVRAKEKSQHRRPKIIDQ
VRRVESLGEQASQRQKHMLETLINKIYTGPLGEEELVQTLYLRIWAMEETPESLKILQMREDIRDQVLMKMTERWLRTLIRG
EKTCLKDFQKRYEEVHPYLMKEKVEQVIMEEAWSLAAHIVQE

5 **secuencia de la proteína M: (SEQ ID NO:11)**

MADIYRFPKFSYEDNGTVEPLPLRTGPDKKAIPYIRIIKVGDPKPGVRYLDLLLGGFFETPKQTTNLGSVSDLTEPTSYS
ICGSGSLPIGVAKYYGTDQELKACTDLRITVRRTVRAGEMIVVMVDSIGAPLLPWSGRLRQGMIFNANKVALAPQCLPVD
KDIRFRVVFVNGTSLGAIITIAKIPKTLADLALPNSISVNLLVTLKTGISTEQKGVLPVDDQGEKKNFMVHLGLIRRKVG
KIYSVEYCKSKIERMRLIFSLGLIGGISFHVQVTGTLSKTFMSQLAWKRAVCFPLMDVNPMMNLVIWAASVEITGVDAVFQ
PAIPRDFRYYPNVVAKNIGIRKLL

10 **secuencia de la proteína F (SEQ ID NO:13)**

MTAYIQRSQCISTSLLVLTTLVSCQIPRDRLSNIGVIVDEGKSLKIAGSHESRYIVLSLVPGVLENGCGTAQVIQYKSL
LNRLLIPLRDALDLQEALITVNDTTQAGVPQSRFFGAVIGTIALGVATSAQITAGIALAEAREAKRDIALIKESMTKTH
KSIELLQNAVGEQILALKTLQDFVNDIENKPAISELGCETAALRLGIKLTQHYSGLLTAFGSNFGTIGEKSLTLQALSSLYS
ANITEIMTTIRTGQSNIDYVITEQIKGTVIDDLERYMVTLSVKIPIILSEVPGVLIHKASSISYNIDGEEWVTVPSHIL
SRASFLGGADITDCVESRLTYICPRDPAQLIPDSQQKCILGDTTRCPVTKVVDSLIPKFAFVNGGVVANCIASTCTCGTGR
RPISQDRSKGVVFLTHDNCGLIGVNGVELYANRRGHDATWGVQNLTVGPAIAIRPVDISLNLADATNFLQDSKAELEKARK
ILSEVGRWYNSRETVITIIIVMVVILVVIIVIVIVLYRLRRSMLMGNPDDRIPRDTYTTLEPKIRHMYTNGGFDAMAER

secuencia de la proteína HN (SEQ ID NO:15)

MDGDRGKRDSYWSSTSPSGSTTKLASGWERSSKVDTWLLILSFTQWALSIAIVIIICIIISARQGYSMKEYSMTVEALNMSSR
EVKESLTSIRQEVIAAVNIQSSVQTGIPVLLNKNRSDVIQMIKSCSRQELTQLCESTIAVHHAEGIAPLEPHSFWRCF
VGEPYLSDDPKISLLPGPSLLSGSTTISGCVRLPSSLIGEAIIYAYSSNLITQGCADIGKSYQVLQGLYISLNSDMFPLNLP
VVSHTYDINDNRKSCSVATGTRGYQLCSMPTVDERTDYSSDGIEDLVLDVLDLKGSTKSHRYRNSEVDLHDPFSALYPSV
GNGIATEGSLIFLGYGGLTTPAQGDKCRTQGCQQVSDTCNEALKITWLGKQVVSVIIQVNDYLSERPDIRVTTIPITQ
15 NYLGAEGRLKLGDRVYIYTRSSGWSQLQIGVLDVSHPLTINWTPHEALS RPNNEECNWNTPCKECSGVYTDAYPLSP
DAANVATVTLYANTS RVNPTIMYSNTTNIINMLRIKDVQLEAAYTTTSCITHFGKGYCFHIIIEINQKSLNTLQPMLFKTISI
PKLCKAES

20 **secuencia de la proteína L (SEQ ID NO:17)**

MDGQESSQNPSDILYPECHLNSPIVRGKIAQLHVLLDVNQPYRLKDDSIINTKHKIRNGG
 LSPRQIKIRSLGKALQRTIKDLDRYTFEPYPTYSQELLRLDIPEICDKIRSVFAVSDRLTREL
 SSGFQDLWLNIFKQLGNIEGREGYDPLQDIGTIPEITDKYSRNRWYRPFLTWFSIKYDMR
 WMQKTRPGGPLDTSNSHNLECKSYTLVTYGDLVMILNKLTGTGYILTPELVLMYCDV
 VEGRWNMSAAGHLDKKSGITSKGEELWELVDSLFSLSGEEIYNVIALLEPLSLALIQLN
 DPVIPLRGAFMRHVLTTELQTVLTSRDVYTDAAEADTIVESLLAIFHGTSIDEKAEIFSFFRTF
 GHPSLEAVTAADKVRAHMYAQKAIKLTLYECHA VFCTIIINGYRERHGGQWPPCDFPD
 HVCLELRNAQGSNTAISYECAVDNYTSFIGFKFRKFIEPQLDEDLTIYMKDKALSPRKEA
 WDSVYPDSNLYYKAPESSETRRLIEVFINDENFNPEEIINYVESGDWLKDEEFNISYSLKE
 KEIKQEGRLFAMTYKMRAVQVLAETLLAKGIGELFRENGMVKGEIDLLKRLTTLSSVSG
 VPRDTSVYNNKSSEKRNEMENKNSGGYWDEKKRSRHEFKATDSSTDGYETLSCFLT
 TDLKKYCLNWRFEALFGQRCNEIFGFKTFNWMHPVLERCTIYVGDYPCPVADRMH
 RQLQDHADSGIFIHNRGGIEGYCQKLWTLISISAIHLAAVRVGVVRSAMVQGDNDQAI
 VTSRVPVAQTYKQKNHVYEEITKYFGALRHVMFDVGHELKLNETHISSKMFVYSKRIY
 YDGKILPQCLKALTKCVFWSETLVDENRSACSNISTSIAKAIENGYSPILGYCIALYKTCQ
 QVCISLGMTINPTISPTVRDQYFKGKNWLRCAVLIPANVGGFNMYMSTSRCFVRNIGDPAV
 AALADLKR FIRADLLDKQVLYRVMNQEPGDSSFLDWASDPYSCNLPHSQSITTIKNITA
 RSVLQESPNPLLSGLFTETSGEEDLNLASFLMDRKVILPRVAHEILGNSLTGVREAIAGML
 DTTKSLVRASVRKGGLSYGILRRLVNYDLLQYETLTRTLRKPVKDNIEYEMCSVELAV
 GLRQKMWIHLTYGRPIHGLETDPLELLRGIFIEGSEVCKLCRSEGADPIYTWFYLPDNID
 LDTLT
 NGCPAIRIPYFGSATDERSEAQLGYVRNLSKPAKAAIRIAMVYTWAYGTDEISWMEAAL
 IAQTRANLSLENLKLTPVSTSTNLSHRLKDTATQMKFSSATLVRASRFITISNDNMALK
 EAGESKDTNLVYQQIMLTGLSLFEFNMR YKKGSLGKPLILHLHLNNGCCIMESPQEANIP
 PRSTLDLEITQENNKLIYDPDPLKDVDLELFSKVRDVVHTVDMTYWSDDEVIRATSICTA
 MTIADTMSQLDRDNLKEMIALVNDDDVNSLITEFMVIDVPLFCSTFGGILVNQFAYS LY
 GLNIRGREEIWGHVVRILKDTSHAVLKVLSNALSHPKIFKRFWNAGVVEPVYGPNSNQ
 DKILLALSVCESVDLFMHDWQGGVPLEIFICDNDPDVADMRRSSFLARHLAYLCSLAE
 ISRDGPRLESMSLERLESLSYLELTFLLDDPVLRYSQLTGLVIKVFSTLT YIRKSSIKVL
 RTRGIGVPEVLEDWDPEADNALLDGIAAEIQQNIPLGHQTRAPFWGLRVSKSQVLRRLRG
 YKEITRGEIGRSGVGLTLPFDGRYLSHQLRFLFGINSTSCLKALELT YLLSPLVDKDKDRLY
 LGEGAGAMLSCYDATLGPCINYNSGVYSCDVNGQRELNIYPAEVALVGKLNNTSL
 GQRVKVLFNGNPGSTWIGNDECEALIWNELQNSSIGLVHCDMEGGDHKDDQVVLHEH
 YSVIRIAYLVGDRDVVLISKIAPRLGTDWTRQLSLYLRWDEVNLIVLKTSPASTEMYL
 LSRHPKSDIIEDSKTVLASLLPLSKEDSIKIEKWILIEKAKAHEWVTRELREGSSSSGMLRP
 YHQALQTFGFEPNLYKLSRDFLSTMNIADTHNCMIAFNRLKDTIFEWARITESDKRLKL
 TGKYDLYPVRDSGKKTISRRLVLSWISLSMSTRLVGTGSPDQKFEARLQLGIVSLSSREI
 RNLRVITKTLRYRFEDIHSITYRFLTKEIKILMKILGAVKMFARQNEYTTVIDDGLSDI
 EPYDSS

pSeVc-RSVF(F-HN) (SEQ ID NO:18)

ACCAAACAAGAGAAAAAACATGTATGGGATATATAATGAAGTTAGACAGGATTTTAGGGT
CAAAGTATCCACCCTGAGGAGCAGGTTCCAGACCCTTTGCTTTGCTGCCAAAGTTCACGA
TGGCCGGGTTGTTGAGCACCTTCGATACATTTAGCTCTAGGAGGAGCGAAAGTATTAATA
AGTCGGGAGGAGGTGCTGTTATCCCCGCCAGAGGAGCACAGTCTCAGTGTTCGTA
GCTACTAGGCCAAAGTGTGACTGATGATGCAGACAAGTTATTCATTGCAACTACCTTCCTAGCTCACT
CATTGGACACAGATAAAGCAGCACTCTCAGAGAGGAGGGTTCCTCGTCTCTCTGCTTGCCA
TGGCTTACAGTAGTCCAGAATTGTA
CTTGACAACAAACGGAGTAAACGCCGATGTCAAAT
ATGTGATCTACAACATAGAGAAAGACCCTAAGAGGACGAAGACAGACGATTCAATTGTGA
AGACGAGAGATATGGAATATGAGAGGACCACAGAATGGCTGTTTGGACCTATGGTCAACA
AGAGCCCACTCTTCCAGGGTCAACGGGATGCTGCAGACCCTGACACACTCCTTCAAACCT
ATGGGTATCCTGCATGCCTAGGAGCAATAATTGTCCAAGTCTGGATTGTGCTGGTGAAGG
CCATCACAAGCAGCGCCGGCTTAAGGAAAGGGTCTTCAACAGGTTAGAGGCGTTCAGAC
AAGACGGCACCGTGAAAGGTGCCTTAGTTTTACTGGGGAGACAGTTGAGGGGATAGGCT
CGTTATGAGATCTCAGCAAAGCCTTGTATCTCTCATGGTTGAGACCCTTGTGACTATGA
ATACTGCAAGATCTGATCTCACCACATTAGAGAAGAACATCCAGATCGTTGGGAACTACA
TCCGAGATGCAGGGCTGGCTTCCTTCATGAACACTATTA
AATATGGGGTGGAGACAAAGA
TGGCAGCTCTAACGTTGTCAAACCTGAGGCCGATATTAATAAGATTAGAAGCCTCATAG
ACACCTACCTGTCAA
AAGCCCCAGAGCTCCCTTATCTGTATCCTCAAGGACCCTGTTC
ATGGTGAATTTGCTCCAGGCAATTATCCTGCACTATGGAGTTACGCCATGGGAGTCGCCG
TCGTACAGAACAAGGCAATGCAGCAGTACGTCACAGGGAGGACATACCTTGATATGGAAA
TGTTCTTACTAGGACAAGCCGTGGCAAAGGATGCTGAATCGAAGATCAGCAGTGCCCTGG
AAGATGAGTTAGGAGTGACGGATACAGCCAAGGAGAGGCTCAGACATCATCTGGCAA
ACTTGTC
CCGGTGGGGATGGTGCTTACCACAAACCAACAGGCGGTGGTGCAATTGAGGTAGCTC
TAGACAATGCCGATATCGACCTAGAAACAGAAGCTCATGCGGACCAGGACGCTAGGGGTT
GGGGTGGAGAAAGTGGTGA
AAGATGGGCACGTCAGGTGAGTGGTGGCCACTTTGTCACAC
TACATGGGGCTGAACGGTTAGAGGAGGAAACCAATGATGAGGATGTATCAGACATAGAGA
GAAGAATAGCCATGAGACTCGCAGAGAGACGGCAAGAGGATTCTGCAACCCATGGAGATG
AAGGCCGAATAACGGTGTGATCAGCAGCAAGATGACGATACCGCAGCAGTAGCTGGGA
TAGGAGGAATCTAGGATCATA
CGAGGCTTCAAGGTA
CTTGATCCGTAGTAAGAAAACTT
AGGGTGA
AAGTTCATCCACTGATCGGCTCAGGCAAGGCCACACCCAACCCACCGACCAC
ACCCAGCAGTCGAGACAGCCACGGCTTCGGCTACACTTACCGCATGGATCAAGATGCCTT
CATTCTTAAAGAAGATTCTGAAGTTGAGAGGGAGGCGCCAGGAGGAAGAGAGTCGCTCTC
GGATGTTATCGGATTCCTCGATGCTGTCCTGTGAGTGAACCAACTGACATCGGAGGGGA
CAGAAGCTGGCTCCACAACACCATCAACACTCCCCAAGGACCAGGCTCTGCCCATAGAGC
CAA
AAGTGAGGGCGAAGGAGAAGTCTCAACACCGTCGACCCAAGATAATCGATCAGGTGA
GGAGAGTAGAGTCTCTGGGAGAACAAGCAAGCCAGAGGCAGAAGCACATGCTGGAAACCT
TGATAAACAAAATATACACCGGGCCTTTGGGGGAAGAACTGGTACAAACTCTGTATCTCA
GGATCTGGGCGATGGAGGAGACTCCGGAATCCTTGAAAATCCTCCAAATGAGAGAGGATA
TCCGAGATCAGGTATTGAAGATGAAAACAGAGAGATGGCTGCGCACCCCTGATAAGAGGGG
AGAAGACCAAGCTGAAGGACTTCCAGAAGAGGTACGAGGAGGTACATCCCTACCTGATGA
AGGAGAAGGTGGAGCAAGTAATAATGGAAGAAGCATGGAGCCTGGCAGCTCACATAGTGC
AAGAGTAACTGGGGTCTTGGTGATTCTAGCCCCGA
ACTCGAAGAGGCTGTGCTACGGAG
GAACAAAAGAAGACCTACCAACAGTGGGTCCAAACCTTACTCCAGCAACCGTGCCTGG
CACCCGGTCCCCACCGCTGAATCGTTACAACAGCACAGGGTCACCACCAGGAAAACCCCC
ATCTACACAGGATGAGCACATCAACTCTGGGGACACCCCCGCCGTCAGGGTCAAAGACCG
GAAACCACCAATAGGGACCCGCTCTGTCTCAGATTGTCCAGCCAACGGCCGCCAATCCA
CCCGGTCTAGAGACCGACTCAACAAAAAAGGGCATAGGAGAGAACACATCATCTATGAA
AGAGATGGCTACATTGTTGACGAGTCTTGGTGTAATCCAGTCTGCTCAAGAATTTCGAGTC

ATCCCGAGACGCGAGTTATGTGTTTTGCAAGACGTGCCCTAAAGTCTGCAAACCTATGCAGA
 GATGACATTCAATGTATGCGGCCCTGATCCTTTCTGCCGAGAAATCTTCCGCTCGTAAGGT
 AGATGAGAACAACAACACTGCTCAAACAGATCCAAGAGAGCGTGGAATCATTCCGGGATAT
 TTACAAGAGATTCTCTGAGTATCAGAAAGAACAAGAACTCATTGCTGATGTCCAACCTATC
 TACACTTCATATCATCACAGATAGAGGTGGCAAGACTGACAACACAGACTCCCTTACAAG
 GTCCCCCTCCGTTTTTTGCAAAAATCAAAAAGAGAACAAGACTAAGGCTACCAGGTTTGACCC
 ATCTATGGAGACCCTAGAAGATATGAAGTACAAACCGGACCTAATCCGAGAGGGATGAATT
 TAGAGATGAGATCCGCAACCCGGTGTACCAAGAGAGGGACACAGAACCCAGGGCCTCAAA
 CGCATCACGCCTCCTCCCCCTCCAAAGAGAAGCCACAATGCACCTCTCAGGCTCGTCAT
 AGAGAGCAGTCCCCTAAGCAGAGCTGAGAAAGCAGCATATGTGAAATCATTATCCAAGTG
 CAAGACAGACCAAGAGGTTAAGGCAGTCATGGAACCTCGTAGAAGAGGACATAGAGTCACT
 GACCAACTAGATCCCGGGTGAGGCATCCTACCATCCTCAGTCATAGAGAGATCCAATTA
 TTAACAGCATCAGCCAGTAAAGATTAAGAAAACTTAGGGTGAAAGAAATTCACCTAAC
 ACGGCGCAATGGCAGATATCTATAGATTCCCTAAGTTCTCATATGAGGATAACGGTACTG
 TGGAGCCCCTGCCCTGAGAACTGGTCCAGATAAGAAAGCCATCCCCCTACATCAGGATTA
 TCAAGGTAGGAGACCCTCCTAAACATGGAGTGAGATACCTAGATTTATTGCTCTTGGGTT
 TCTTTGAGACACCGAAACAACAACCAATCTAGGGAGCGTATCTGACTTGACAGAGCCGA
 CCAGTACTCAATATGCGGCTCCGGGTGCTTACCCATAGGTGTGGCCAAATACTACGGGA
 CTGATCAGGAACTCTTAAAGGCCTGCACCGATCTCAGAATTACGGTGAGGAGGACTGTTC
 GAGCAGGAGAGATGATCGTATACATGGTGGATTTCGATTGGTGCTCCACTCCTACCATGGT
 CAGGCAGGCTGAGACAGGGAATGATATTTAATGCAAACAAGGTTCGACTAGCTCCCCAAT
 GCCTCCCTGTGGACAAGGACATAAGATTCAGAGTGGTGTGTTGTCAATGGGACATCTCTAG
 GGGCAATCACCATAGCCAAGATCCCAAAGACCCTTGACAGACCTTGCAATGCCCCAATCTA
 TATCCGTTAACCTACTGGTGACACTCAAGACCGGGATCTCCACAGAACAAGGGGGTAC
 TCCCAGTACTTGATGATCAAGGGGAGAAAAAGCTCAATTTTATGGTGCACCTCGGGTTGA
 TCAGGAGAAAGGTTCGGGAAGATATACTCTGTTGAGTACTGCAAGAGCAAGATTGAGAGAA
 TGCGGCTGATTTTCTCACTTGGGTTAATCGGCGGTATAAGCTTCCATGTTTCAGGTTACTG
 GGACACTATCTAAGACATTCATGAGTCAGCTCGCATGGAAGAGGGCAGTCTGCTTCCCAT
 TAATGGATGTGAATCCCCATATGAACCTGGTGAATTTGGGCGGCATCTGTAGAAATCACAG
 GCGTCGATGCGGTGTTCCAACCGGCCATCCCTCGTGATTTCCGCTACTACCCTAATGTTG
 TGGCTAAGAACATCGGAAGGATCAGAAAGCTGTAAATGTGCACCCATCAGAGACCTGCGA
 CAATGCCCCAAGCAGACACCACCTGGCAGTCGGAGCCACCGGGTCACTCCTTGTCTTAAA
 TAAGAAAACTTAGGGATAAAGTCCCTTGTGAGTGTGTTGGTTGCAAACTCTCCGTACGG
 GAAACATGACAGCATATATCCAGAGGTCACAGTGCATCTCAACATCACTACTGGTTGTTC
 TCACCACATTGGTCTCGTGTGAGATTCCCAGGGATAGGCTCTCTAACATAGGGGTCATAG
 TCGATGAAGGGAAATCACTGAAGATAGCTGGATCCCACGAATCGAGGTACATAGTACTGA
 GTCTAGTTCCGGGGGTAGACCTTGAGAATGGGTGCGGAACAGCCCAGGTTATCCAGTACA
 AGAGCCTACTGAACAGGCTGTTAATCCCATTGAGGGATGCCTTAGATCTTCAGGAGGCTC
 TGATAACTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCGGTGTTCACAGTCGAGATTCTTCG
 GTGCTGTGATTGGTACTATCGCACTTGGAGTGGCGACATCAGCACAGATCACCGCAGGGA
 TTGCACTAGCCGAAGCGAGGGAGGCCAAAAGAGACATAGCGCTCATCAAAGAATCGATGA
 CAAAAACACACAAGTCTATAGAAGTCTGCAAAAACGCTGTGGGGGAACAATTCTTGCTC
 TAAAGACACTCCAGGATTTCTGTAATGATGAGATCAAACCCGCAATAAGCGAATTAGGCT
 GTGAGACTGCTGCCTTAAGACTGGGTATAAAATTGACACAGCATTACTCCGGGCTGTTAA
 CTGCGTTCCGGCTCGAATTTCCGAACCATCGGAGAGAAGAGCCTCACGCTGCAGGCGCTGT
 CTTCACTTTACTCTGCTAACATTAAGTACTGAGATTATGACCACAATCAGGACAGGGCAGTCTA
 ACATCTATGATGTCATTTATACAGAACAGATCAAAGGAACGGTGATAGATGTGGATCTAG
 AGAGATACATGGTTACCTGTCTGTGAAGATCCCTATTCTTTCTGAAGTCCCAGGTGTGC
 TCATACACAAGGCATCGTCTATTTCTTACAACATAGACGGGGAGGAATGGTATGTGACTG
 TCCCAGCCATATACTCAGTCGTGCTTCTTTCTTAGGGGGTGCAGACATAACCGATTGTG

TTGAGTCCAGGTTGACCTATATATGCCCCAGGGATCCCCGCACAACTGATACCTGACAGCC
 AGCAAAAGTGTATCCTGGGGGACACAACAAGGTGTCCTGTCACAAAAGTTGTGGACAGCC
 TTATCCCCAAGTTTGTCTTTTGTGAATGGGGGCGTTGTTGCTAACTGCATAGCATCCACAT
 GTACCTGCGGGACAGGCCGAAGACCAATCAGTCAGGATCGCTCTAAAGGTGTAGTATTCC
 TAACCCATGACAACCTGTGGTCTTATAGGTGTCAATGGGGTAGAATTGTATGCTAACCGGA
 GAGGGCACGATGCCACTTGGGGGGTCCAGAACTTGACAGTCGGTCCGCAATTGCTATCA
 GACCCGTTGATATTTCTCTCAACCTTGCTGATGCTACGAATTTCTTGCAAGACTCTAAGG
 CTGAGCTTGAGAAAGCACGGAAAATCCTCTCTGAGGTAGGTAGATGGTACAACCTCAAGAG
 AGACTGTGATTACGATCATAGTAGTTATGGTCGTAATATTGGTGGTCATTATAGTGATCG
 TCATCGTGCTTTATAGACTCAGAAGGTCAATGCTAATGGGTAATCCAGATGACCGTATAC
 CGAGGGACACATATACATTAGAGCCGAAGATCAGACATATGTACACAAACGGTGGGTTTG
 ATGCGATGGCTGAGAAAAGATGATCACGAGTTTAAACAGATGTCTTGTAAGCAGGCATG
 GTATCCGTTGAGATCTGTATATAATAAGAAAACTTAGGGTGAAAAGTGAGGTCGCGCGGT
 ACTTTAGCTGCGGCCGCACAATGGAGTTGCTAATCCTCAAAGCAAATGCAATTACCACAA
 TCCTCACTGCAGTCACATTTTGTGTTTGTCTGGTCAAACATCACTGAAGAATTTTATC
 AATCAACATGCAGTGCAGTTAGCAAAGGCTATCTTAGTGTCTTGAGAAGTGGTTGGTATA
 CCAGTGTATAACTATAGAATTAAGTAATATCAAGAAAAATAAGTGTAATGGAACAGATG
 CCAAGGCAAAATTGATAAAAACAAGAATTAGATAAAATATAAAAATGCTGTAACAGAATTGC
 AGTTGCTCATGCAAAGCACACAAGCAACAAACAATCGAGCCAGAAGAGAAGTACCAAGGT
 TTATGAATTATACACTCAACAATGCCAAAAAAACCAATGTAACATTAAGCAAGAAAAGGA
 AAAGAAGATTTCTTGGTTTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGCGTTGCTG
 TATCTAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACAAGATCAAAGTGCTCTACTATCCA
 CAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCAATGGAGTTAGTGTCTTAACCAGCAAAGTGTTAG
 ACCTCAAAAATATATAGATAAAACAATTTGTTACCTATTGTGAACAAGCAAAGCTGCAGCA
 TATCAAATATAGAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGACTACTAGAGATTA
 CCAGGGAATTTAGTGTTAATGCAGGTGTAACCTGTAAGCACTTACATGTTAACTA
 ATAGTGAATTATTGTCATTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAA
 TGTCCAACAATGTTCAAATAGTTAGACAGCAAAGTTACTCTATCATGTCCATAATAAAG
 AGGAAGTCTTAGCATATGTAGTACAATTACCACTATATGGTGTATGGATACACCCTGTT
 GGAAACTACACACATCCCCTCTATGTACAACCAACACAAAAGAAGGGTCCAACATCTGTT
 TAACAAGAAGTGCAGAGGATGGTACTGTGACAATGCAGGATCAGTATCTTTCTTCCCAC
 AAGCTGAAACATGTAAAGTTCAATCAAATCGAGTATTTTGTGACACAATGAACAGTTTAA
 CATTACCAAGTGAAGTAAATCTCTGCAATGTTGACATATTCAACCCCAAATATGATTGTA
 AAATTATGACCTCAAAAACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATCACATCTCTAGGAGCCATTG
 TGTCATGCTATGGCAAACTAAATGTACAGCATCCAATAAAAATCGTGGAATCATAAAGA
 CATTTTCTAACGGGTGCGATTATGTATCAAATAAAGGGGTGGACACTGTGTCTGTAGGTA
 ACACATTATATTATGTAATAAGCAAGAAGGTAAAAGTCTCTATGTAATAAGGTGAACCAA
 TAATAAATTTCTATGACCCATTAGTATTTCCCCTCTGATGAATTTGATGCATCAATATCTC
 AAGTCAACGAGAAGATTAACCAGAGCCTAGCATTATTCGTAATCCGATGAATTATTAC
 ATAATGTAATTGCTGGTAAATCCACCACAAATATCATGATAACTACTATAATTATAGTGA
 TTATAGTAATATTGTTATCATTAAATTGCTGTTGGACTGCTCTTATACTGTAAGGCCAGAA
 GCACACCAGTCACACTAAGCAAAGATCAACTGAGTGGTATAAATAAATTGCAATTTAGTA
 ACTAATTATAAGAAAAACTTAGGGTGAAAGTGAGCGGCCGCAAACAAGCACAGATCATGG
 ATGGTGATAGGGGCAAACGTGACTCGTACTGGTCTACCTCTCCTAGTGGTAGCACTACAA
 AATTAGCATCAGGTTGGGAGAGGTCAAGTAAAGTTGACACATGGTTGCTGATCTCTCAT
 TCACCCAGTGGGCTTTGTCAATTGCCACAGTGATCATCTGTATCATAATTTCTGCTAGAC
 AAGGGTATAGTATGAAAGAGTACTCAATGACTGTAGAGGCATTGAACATGAGCAGCAGGG
 AGGTGAAAGAGTCACTTACCAGTCTAATAAGGCAAGAGGTTATCGCAAGGGCTGTCAACA
 TTCAGAGCTCTGTGCAAAACCGGAATCCCAGTCTTGTGTAACAAAAACAGCAGGGATGTCA
 TCCAGATGATTGATAAGTCGTGCAGCAGACAAGAGCTCACTCAGCTCTGTGAGAGTACGA

TCGCAGTCCACCATGCCGAGGGAATTGCCCTCTTGAGCCACATAGTTTCTGGAGATGCC
 CTGTCCGAGAACCGTATCTTAGCTCAGATCCTAAAATCTCATTGCTGCCTGGTCCGAGCT
 TGTTATCTGGTCTACAACGATCTCTGGATGTGTTAGGCTCCCTTCACTCTCAATTGGCG
 AGGCAATCTATGCCTATTCATCAAATCTCATTACACAAGGTTGTGCTGACATAGGGAAAT
 CATATCAGGTCCTGCAGCTAGGGTACATATCACTCAATTCAGATATGTTCCCTGATCTTA
 ACCCGTAGTGTCCACACTTATGACATCAACGACAATCGGAAATCATGCTCTGTGGTGG
 CAACCGGACTAGGGGTATCAGCTTTGCTCCATGCCGACTGTAGACGAAAGAACCGACT
 ACTCTAGTGATGGTATCGAGGATCTGGTCCCTGATGTCCTGGATCTCAAAGGGAGCACTA
 AGTCTCACCGGTATCGCAACAGCGAGGTAGATCTTGATCACCCGTTCTCTGCACTATAACC
 CCAGTGTAGGCAACGGCATTGCAACAGAAGGCTCATTGATATTTCTTGGGTATGGTGGGC
 TAACCACCCCTCTACAGGGTGATACAAAATGTAGGACCCAAGGATGCCAACAGGTGTCCG
 AAGACACATGCAATGAGGCTCTGAAAATTACATGGCTAGGAGGGAAACAGGTGGTCAGCG
 TGATCATCCAGGTCAATGACTATCTCTCAGAGAGGCCAAAGATAAGAGTCACAACCATT
 CAATCACTCAAACTATCTCGGGGCGGAAGGTAGATTATTAATAATTGGGTGATCGGGTGT
 ACATCTATAACAAGATCATCAGGCTGGCACTCTCAACTGCAGATAGGAGTACTTGATGTCA
 GCCACCCTTTGACTATCAACTGGACACCTCATGAAGCCTTGTCTAGACCAGGAAATGAAG
 AGTGCAATTGGTACAATACGTGTCCGAAGGAATGCATATCAGGCGTATACACTGATGCTT
 ATCCATTGTCCCCTGATGCAGCTAACGTGCTACCGTCACGCTATATGCCAATACATCGC
 GTGTCAACCAACAATCATGTATTCTAACACTACTAACATTATAAATATGTTAAGGATAA
 AGGATGTTCAATTAGAGGCTGCATATAACCACGACATCGTGTATCACGCATTTTGGTAAAG
 GCTACTGCTTTCACATCATCGAGATCAATCAGAAGAGCCTGAATACCTTACAGCCGATGC
 TCTTTAAGACTAGCATCCCTAAATTATGCAAGGCCGAGTCTTAAATTTAACTGACTAGCA
 GGCTGGCGCGCCTTGTGACACTAGAGTCATCTCCGAACATCCACAATATCTCTCAGTCT
 CTTACGTCTCTCACAGTATTAAGAAAAACCCAGGGTGAATGGGAAGCTTGCCATAGGTCA
 TGGATGGGCAGGAGTCTCCCAAACCCCTTCTGACATACTCTATCCAGAATGCCACCTGA
 ACTCTCCCATAGTCAGGGGGAAGATAGCACAGTTGCACGTCTTGTTAGATGTGAACCAGC
 CCTACAGACTGAAGGACGACAGCATAATAAATATTACAAAGCACAAAATTAGGAACGGAG
 GATTGTCCCCCGTCAAATTAAGATCAGGCTCTGGGTAAGGCTCTTCAACGCACAATAA
 AGGATTTAGACCGATACACGTTTGAACCGTACCCAACCTACTCTCAGGAATTACTTAGGC
 TTGATATAACCAGAGATATGTGACAAAATCCGATCCGTCTTCGCGGTCTCGGATCGGCTGA
 CCAGGGAGTTATCTAGTGGGTTCCAGGATCTTTGGTTGAATATCTTCAAGCAACTAGGCA
 ATATAGAAGGAAGAGAGGGGTACGATCCGTTGCAGGATATCGGCACCATCCCGGAGATAA
 CTGATAAGTACAGCAGGAATAGATGGTATAGGCCATTCTAACTTGGTTCAGCATCAAAT
 ATGACATGCGGTGGATGCAGAAGACCAGACCGGGGGGACCCCTTGATACCTCTAATTCAC
 ATAACCTCCTAGAATGCAAATCATACTCTAGTAACATACGGAGATCTTGTGATGATAC
 TGAACAAGTTGACATTGACAGGGTATATCCTAACCCCTGAGCTGGTCTTGATGTATTGTG
 ATGTTGTAGAAGGAAGGTGGAATATGTCTGCTGCAGGGCATCTAGATAAGAAGTCCATTG
 GGATAACAAGCAAAGGTGAGGAATTATGGGAAGTGGATTCCCTCTTCTCAAGTCTTG
 GAGAGGAAATATACAATGTCATCGCACTATTGGAGCCCCTATCACTTGCTCTCATAAAC
 TAAATGATCCTGTTATACCTCTACGTGGGGCATTATGAGGCATGTGTTGACAGAGCTAC
 AGACTGTTTTAACAAGTAGAGACGTGTACACAGATGCTGAAGCAGACACTATTGTGGAGT
 CGTFACTCGCCATTTTCCATGGAACCTCTATTGATGAGAAAGCAGAGATCTTTTCCTTCT
 TTAGGACATTTGGCCACCCAGCTTAGAGGCTGTCCTGCCGCCGACAAGGTAAGGGCCC
 ATATGTATGCACAAAAGGCAATAAAGCTTAAGACCCTATACGAGTGTGATGCAGTTTTTT
 GCACTATCATATAAATGGGTATAGAGAGAGGCATGGCGGACAGTGGCCCCCTGTGACT
 TCCCTGATCACGTGTGTCTAGAATAAGGAACGCTCAAGGGTCCAATACGGCAATCTCTT
 ATGAATGTGCTGTAGACAACATAACAAGTTTCATAGGCTTCAAGTTTCGGAAGTTTATAG
 AACCACAACACTAGATGAAGATCTCACAATATATATGAAAGACAAAGCACTATCCCCCAGGA
 AGGAGGCATGGGACTCTGTATACCCGGATAGTAATCTGTACTATAAAGCCCCAGAGTCTG
 AAGAGACCCGGCGGCTTATTGAAGTGTTCATAAATGATGAGAATTTCAACCCAGAAGAAA

TTATCAATTATGTGGAGTCAGGAGATTGGTTGAAAGACGAGGAGTTCAACATCTCGTACA
 GTCTCAAAGAGAAAAGAGATCAAGCAAGAGGGTCGTCTATTTCGCAAAAATGACTTATAAGA
 TGCGAGCCGTACAGGTGCTGGCAGAGACACTACTGGCTAAAGGAATAGGAGAGCTATTCA
 GGGAAAATGGGATGGTTAAGGGAGAGATAGACCTACTTAAAAGATTGACTACTCTTTCTG
 TCTCAGGCGTCCCCAGGACTGATTCAAGTGTACAATAACTCTAAATCATCAGAGAAGAGAA
 ACGAAGGCATGGAAAATAAGAACTCTGGGGGGTACTGGGACGAAAAGAAGAGGTCCAGAC
 ATGAATTCAAGGCAACAGATTCATCAACAGACGGCTATGAAACGTTAAGTTGCTTCCTCA
 CAACAGACCTCAAGAAATACTGCTTAAACTGGAGATTTGAGAGTACTGCATTGTTTGGTC
 AGAGATGCAACGAGATATTTGGCTTCAAGACCTTCTTTAACTGGATGCATCCAGTCCTTG
 AAAGGTGTACAATATATGTTGGAGATCCTTACTGTCCAGTCGCCGACCGGATGCATCGAC
 AACTCCAGGATCATGCAGACTCTGGCATTTCATACATAATCCTAGGGGGGGCATAGAAG
 GTTACTGCCAGAAGCTGTGGACCTTAATCTCAATCAGTGCAATCCACCTAGCAGCTGTGA
 GAGTGGGTGTCAGGGTCTCTGCAATGGTTTCAAGGGTGACAATCAAGCTATAGCCGTGACAT
 CAAGAGTACCTGTAGCTCAGACTTACAAGCAGAAGAAAAATCATGTCTATGAGGAGATCA
 CCAAATATTTCCGTGCTCTAAGACACGTCATGTTTGTATGATGAGGGCACGAGCTAAAATTGA
 ACGAGACCATCATTAGTAGCAAGATGTTTGTCTATAGTAAAAGGATATACTATGATGGGA
 AGATTTTACCACAGTGCCTGAAAGCCTTGACCAAGTGTGTATTCTGGTCCGAGACACTGG
 TAGATGAAAACAGATCTGCTTGTTCGAACATCTCAACATCCATAGCAAAAGCTATCGAAA
 ATGGGTATTCTCCTATACTAGGCTACTGCATTGCGTTGTATAAGACCTGTCAGCAGGTGT
 GCATATCACTAGGGATGACTATAAATCCAATATCAGCCCCGACCGTAAGAGATCAATACT
 TTAAGGGTAAGAATTGGCTGAGATGTGCAGTGTGATTCCAGCAAATGTTGGAGGATTCA
 ACTACATGTCTACATCTAGATGCTTTGTTAGAAATATTGGAGACCCCGCAGTAGCAGCCC
 TAGCTGATCTCAAAAGATTCATCAGAGCGGATCTGTTAGACAAGCAGGTATTATACAGGG
 TCATGAATCAAGAACCCGGTGACTCTAGTTTTCTAGATTGGGCTTCAGACCCTTATTCGT
 GTAACCTCCCGCATTCTCAGAGTATAACTACGATTATAAAGAATATCACTGCTAGATCTG
 TGCTGCAGGAATCCCCGAATCCTCTACTGTCTGGTCTCTTCACCGAGACTAGTGGAGAAG
 AGGATCTCAACCTGGCCTCGTTCCTTATGGACCGGAAAGTCATCCTGCCGAGAGTGGCTC
 ATGAGATCCTGGGTAATTCCTTAACTGGAGTTAGGGAGGCGATTGCAGGGATGCTTGATA
 CGACCAAGTCTCTAGTGAGAGCCAGCGTTAGGAAAGGAGGATTATCATATGGGATATTGA
 GGAGGCTTGTC AATTATGATCTATTGCAGTACGAGACACTGACTAGA ACTCTCAGGAAAC
 CGGTGAAAGACAACATCGAATATGAGTATATGTGTTCAAGTTGAGCTAGCTGTCCGGTCTAA
 GGCAGAAAATGTGGATCCACCTGACTTACGGGAGACCCATACATGGGTTAGAAACACCAG
 ACCCTTTAGAGCTCTTGAGGGGAATATTTATCGAAGGTTTCAAGAGGTGTGCAAGCTTTGCA
 GGTCTGAAGGAGCAGACCCCATCTATACATGGTTCTATCTTCTGACAATATAGACCTGG
 ACACGCTTACAAACGGATGTCCGGCTATAAGAATCCCCTATTTTGGATCAGCCACTGATG
 AAAGGTCGGAAGCCCAACTCGGGTATGTAAGAAATCTAAGCAAACCCGCAAAGGCGGCCA
 TCCGGATAGCTATGGTGTATACGTGGGCCTACGGGACTGATGAGATATCGTGGATGGAAG
 CCGCTCTTATAGCCCAAACAAGAGCTAATCTGAGCTTAGAGAATCTAAAGCTGCTGACTC
 CTGTTTCAACCTCCACTAATCTATCTCATAGGTTGAAAGATACGGCAACCCAGATGAAGT
 TCTCTAGTGCAACACTAGTCCGTGCAAGTCCGTTTATAACAATATCAAATGATAACATGG
 CACTCAAAGAAGCAGGGGAGTCGAAGGATACTAATCTCGTGTATCAGCAGATTATGCTAA
 CTGGGCTAAGCTTGTTTCGAGTTCAATATGAGATATAAGAAAGGTTCCCTTAGGGAAGCCAC
 TGATATTGCACTTACATCTTAATAACGGGTGCTGTATAATGGAGTCCCCACAGGAGGCGA
 ATATCCCCCAAGGTCCACATTAGATTTAGAGATTACACAAGAGAACAATAAATTGATCT
 ATGATCCTGATCCACTCAAGGATGTGGACCTTGAGCTATTTAGCAAGGTCAGAGATGTTG
 TACATACAGTTGACATGACTTATTGGTCAGATGATGAAGTTATCAGAGCAACCAGCATCT
 GTACTGCAATGACGATAGCTGATAACAATGTCTCAATTAGATAGAGACA ACTTAAAAGAGA
 TGATCGCACTAGTAAATGACGATGATGTCAACAGCTTGATTACTGAGTTTATGGTGATTG
 ATGTTCTTTATTTTGTCTCAACGTTCCGGGGTATTCTAGTCAATCAGTTTGCATACTCAC
 TCTACGGCTTAAACATCAGAGGAAGGGAAGAAATATGGGGACATGTAGTCCGGATTCTTA

AAGATACCTCCCACGCAGTTCTAAAAGTCTTATCTAATGCTCTATCCCATCCCCAAAATCT
 TCAAACGATTCTGGAATGCAGGTGTCGTGGAACCTGTGTATGGGCCTAACCTCTCAAATC
 AGGATAAGATACTCTTGGCCCTCTCTGTCTGTGAATATTCTGTGGATCTATTCATGCACG
 ACTGGCAAGGGGGTGTACCGCTTGAGATCTTTATCTGTGACAATGACCCAGATGTGGCCG
 ACATGAGGAGGTCCTCTTTCTTGGCAAGACATCTTGCATACCTATGCAGCTTGGCAGAGA
 TATCTAGGGATGGGCCAAGATTAGAATCAATGAACTCTCTAGAGAGGCTCGAGTCACTAA
 AGAGTTACCTGGAACCTCACATTTCTTGATGACCCGGTACTGAGGTACAGTCAGTTGACTG
 GCCTAGTCATCAAAGTATTCCCATCTACTTTGACCTATATCCGGAAGTCATCTATAAAAG
 TGTTAAGGACAAGAGGTATAGGAGTCCCTGAAGTCTTAGAAGATTGGGATCCCCGAGGCAG
 ATAATGCACTGTTAGATGGTATCGCGGCAGAAATACAACAGAATATTCCTTTGGGACATC
 AGACTAGAGCCCCTTTTTGGGGGTTGAGAGTATCCAAGTCACAGGTACTGCGTCTCCGGG
 GGTACAAGGAGATCACAAGAGGTGAGATAGGCAGATCAGGTGTTGGTCTGACGTTACCAT
 TCGATGGAAGATATCTATCTCACCAGCTGAGGCTCTTTGGCATCAACAGTACTAGCTGCT
 TGAAAGCACTTGAACCTACCTACCTATTGAGCCCCTTAGTTGACAAGGATAAAGATAGGC
 TATATTTAGGGGAAGGAGCTGGGGCCATGCTTTCTGTTATGACGCTACTCTTGGCCCAT
 GCATCAACTATTATAACTCAGGGGTATACTCTTGTGATGTCAATGGGCAGAGAGAGTTAA
 ATATATATCCTGCTGAGGTGGCACTAGTGGGAAAGAAATTAACAATGTTACTAGTCTGG
 GTCAAAGAGTTAAAGTGTATTCAACGGGAATCCTGGCTCGACATGGATTGGGAATGATG
 AGTGTGAGGCTTTGATTTGGAATGAATTACAGAATAGCTCGATAGGCCTAGTCCACTGTG
 ACATGGAGGGAGGAGATCATAAGGATGATCAAGTTGTACTGCATGAGCATTACAGTGTA
 TCCGATCGCGTATCTGGTGGGGGATCGAGACGTTGTGCTTATAAGCAAGATTGCTCCCA
 GGCTGGGCACGGATTGGACCAGGCAGCTCAGCCTATATCTGAGATACTGGGACGAGGTTA
 ACCTAATAGTGCTTAAAACATCTAACCCCTGCTTCCACAGAGATGTATCTCCTATCGAGGC
 ACCCAAATCTGACATTATAGAGGACAGCAAGACAGTGTTAGCTAGTCTCCTCCCTTTGT
 CAAAAGAAGATAGCATCAAGATAGAAAAGTGGATCTTAATAGAGAAGGCAAAGGCTCAGC
 AATGGGTTACTCGGGAATTGAGAGAAGGAAGCTCTTCATCAGGGATGCTTAGACCTTACC
 ATCAAGCACTGCAGACGTTTGGCTTTGAACCAAACCTTGATAAATTGAGCAGAGATTTCT
 TGTCCACCATGAACATAGCTGATACACACAACACTGCATGATAGCTTTCAACAGGGTTTTGA
 AGGATAACAATCTTCGAATGGGCTAGAATAACTGAGTCAGATAAAAAGGCTTAAACTAACTG
 GTAAGTATGACCTGTATCCTGTGAGAGATTCAGGCAAGTTGAAGACAATTTCTAGAAGAC
 TTGTGCTATCTTGGATATCTTTATCTATGTCCACAAGATTGGTAACTGGGTCATTCCCTG
 ACCAGAAGTTTGAAGCAAGACTTCAATTGGGAATAGTTTCATTATCATCCCGTGAAATCA
 GGAACCTGAGGGTTATCACAAAACCTTTATTATACAGGTTTGGAGATATTATACATAGTA
 TAACGTATAGATTCTCACCAAAGAAATAAAGATTTTGATGAAGATTTTAGGGGCAGTCA
 AGATGTTTCGGGGCCAGGCAAATGAATACACGACCGTGATTGATGATGGATCACTAGGTG
 ATATCGAGCCATATGACAGCTCGTAATAATTAGTCCCTATCGTGCAGAACGATCGAAGCT
 CCGCGGTACCTGGAAGTCTTGGACTTGTCCATATGACAATAGTAAGAAAAAATTACAAGA
 AGACAAGAAAATTTAAAAGGATACATATCTCTTAAACTCTTGTCTGGTGGGTCCGCATGG
 CATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTCGTCCACTCGGAT
 GGCTAAGGGAGGGGCCCCCGCGGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCT
 GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGG
 GGTTTTTGTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATCGAGACCTCGATGCCGGCTGATGCGG
 TATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACA
 ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCG
 CCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG
 AGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCAACCCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTC
 GTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT
 GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCA
 AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
 AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGC

CTTCCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTG
 GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT
 CGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTA
 TTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT
 GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
 GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA
 ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC
 CGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
 ACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACT
 CTAGCTTCCCAGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTT
 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT
 GGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTT
 ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
 GGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAG
 ATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAT
 CTCATGACCAAAAATCCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
 AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
 AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCAGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTT
 CCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCG
 TAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACTCGCTCTGCTAATC
 CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAAGTCGTGCTTACCAGGGTTGGACTCAAGA
 CGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
 AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGCTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
 GCCACGCTTCCCAGGAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACA
 GGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTCTGTCGGG
 TTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTA
 TGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGT
 CACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAG
 TGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA
 GCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC
 AGCTGGCAGCAGAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTG
 AGTTAGCTCACTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG
 TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC
 AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGCGTTAATACGACTCACTATA

En particular, la presente divulgación proporciona métodos, composiciones, construcciones de virus recombinantes y formulaciones, y kits para un vector de virus Sendai modificado. Los virus pueden usarse para proteger de infecciones a seres humanos u otros animales, o para su uso *in vitro*. Además, los vectores pueden usarse para obtener imágenes *in vitro* o *in vivo* de la propagación, la eliminación y la transmisión víricas. Adicionalmente, los aspectos divulgados contemplan un vector de virus Sendai con la inserción de un gen extraño. Más particularmente, solo para ejemplo, pero sin limitación, el gen extraño podría ser un gen F y/o un gen G de RSV, un gen de hPIV de Tipo 1-4, para su uso como una vacuna sola o en combinación con otros vectores. Es aceptable la inserción de un gen extraño en cualquiera de las uniones intergénicas; sin embargo, se cree que podría ser preferible insertar el gen extraño entre los genes F y HN del virus Sendai debido a que esto proporciona suficiente virulencia para la infección de un hospedador primates mientras proporciona suficiente expresión del gen F del RSV como para conferir inmunidad protectora. Además, los estudios muestran que una pequeña cantidad de inóculo y una pequeña dosis del virus Sendai podrían potenciar la relación de la infección del aparato respiratorio superior en comparación con la del aparato respiratorio inferior, de modo que exista un margen aumentado de seguridad.

Adicionalmente, aspectos de la presente divulgación contemplan algunas ventajas, incluyendo, solo para ejemplo, pero sin limitación, las siguientes: (i) una vacuna de virus Sendai no modificado es bien tolerada en seres humanos basándose en ensayos clínicos Fase I, (ii) los seres humanos no son un hospedador natural del virus Sendai y no se han notificado casos confirmados de infección por virus Sendai en seres humanos, (iii) los estudios en animales han demostrado la producción de anticuerpos y la estimulación de la inmunidad celular tras la inoculación intranasal de una vacuna de virus Sendai, junto con inmunidad a largo plazo (se observa protección cuando los animales se exponen al patógeno meses después de la inoculación (Jones *et al.*, 2009, Vaccine 27: 1848).

25 I. Desarrollo de una cepa Enders modificada

Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que el vector del virus Sendai recombinante compuesto de un gen extraño y un gen L modificado proporciona un vector eficaz y seguro para usar como vacuna. Se construyeron diversas quimeras génicas de pSeV que contienen genes de la cepa Z y de la cepa Enders, para tener la capacidad de identificar la región que afecta el rescate y el crecimiento del virus. Los resultados del rescate y crecimiento del virus indican que se desea un vector vírico quimérico de Enders/Z. Solo para ejemplo, pero sin limitación, se cree que es importante para un crecimiento eficaz un fragmento *AscI/NheI* que contiene la mitad N-

terminal del gen L. Los virus que contienen esta parte de la cepa Z crecieron mejor que otras construcciones de prueba. La construcción y los datos de crecimiento del virus se resumen a continuación en la Figura 15 y la Tabla 1.

Resumen de los resultados de rescate para diversos virus Sendai de la cepa Enders/cepa Z:

Tabla 1. Comparación del crecimiento del virus mediante el examen del título de HA del líquido alantoideo de huevos inyectados

Tabla 1. Rescate de diversos SeV quiméricos de Enders/Z.

Virus	Porción de la cepa Z	Porción procedente pSeVE(3)	Origen de los genes						Máximo título de HA
			NP	P	M	F	HN	L	
SeV(E)3			E	E	E	E	E	E	370
SeVa	KpnI/NotI (15.281-6.670)	KpnI/NotI (6670-15281)	Z	Z	Z	Z	E	E	730
SeVb	NotI/AscI (6.670-8.441)	NotI/AscI (8.441-6.670)	E	E	E	E	Z	E	240
SeVc	AscI/NheI (8.441-11.960)	AscI/NheI (11.960-8.441)	E	E	E	E	E	*Z/E(1-1.135 Z; 1.136-2.228E)	6.600
SeVd	Sall/NotI (6.670-2.074)	Sall/NotI (2.074-6.670)	Z	E	E	E	Z	Z	2.200

Método: Se infectaron células 293T en placas de 6 pocillos con el virus de la variolovacuna recombinante vTF7.3 (10 ul/pocillo) durante 1 hora y se transfectaron con los ADNc del genoma completo de virus Sendai junto con los genes NP, P y L del virus Sendai en el vector pTF1. Las células se cultivaron durante 2 días, y después, las células recogidas se inyectaron en huevos embrionados. Después de tres días de cultivo a 35 °C se midieron los títulos de virus en el líquido alantoideo. Z: Cepa Z, E: Cepa Enders.

Se hicieron cuatro quimeras para crear un genoma completo del virus Sendai, que combina genes de origen Enders y Z. A continuación se analizó el crecimiento en los virus rescatados y se midió mediante el máximo título de HA. *En el caso de SeVc, el gen L se obtuvo parcialmente de Enders y parcialmente de Z, dando como resultado de forma eficaz una cepa Enders modificada con ocho cambios de aminoácidos en la proteína L de Enders. Esta modificación produjo inesperadamente un virus con capacidad de rescate fácil mediante genética inversa, atenuación en primates y suficiente capacidad de replicación como para sustentar la inmunogenicidad en primates. Los virus Sendai SeVb, SeVc y SeVd se diluyeron también en diversas concentraciones y se inyectaron en los huevos para observar su crecimiento. Los datos también muestran que SeVc y SeVd crecieron mucho mejor que SeVb. Por lo tanto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, basándose en estos datos, para la construcción posterior de virus recombinantes se usó pSeVc. A continuación se describe el comportamiento de la vacuna de Enders modificada que porta el gen F del RSV.

La vacuna basada en Enders modificada es atenuada en primates

La Figura 16 muestra la diferencia entre el crecimiento del virus Sendai Z, el virus Sendai Enders y una vacuna basada en virus Sendai Enders modificada SeVc-RSVF(F-HN) en monos verdes africanos. La vacuna del virus Sendai Enders y la vacuna basada en virus Sendai Enders SeVc-RSVF(F-HN) creció en las vías respiratorias superiores e inferiores (VRS y VRI) de los monos verdes africanos con un título menor, en comparación con la cepa Z de SeV (MPIV1a continuación).

En referencia a las Figuras 16, 16A y B, muestran los títulos medios diarios de virus de un virus Sendai de la cepa Z (MPIV1) y del virus paragripal humano tipo 1 (HPIV1) en un hisopado nasofaríngeo (VRS) o un lavado traqueal (VRI) después de la vacunación intranasal e intratraqueal (Skiadopoulos *et al.* 2002 Virology 297:153), respectivamente. Como se demuestra en este panel, el título máximo de MPIV1 después de una dosis de 10e6 (administrados por vía IT e IN) superó a 10e4 en Las VRS y superó a 10e6 en los VRI.

En referencia a las Figuras 16, 16C y D, muestran títulos diarios después de la vacunación con la vacuna de virus Sendai Enders (SeV) o la vacuna basada en virus Sendai Enders modificado recombinante que expresa F del RSV (SeVc-RSVF(F-HN)). Cuando las dosis de la vacuna fueron 10e6 (administradas por vía IT e IN), los títulos víricos máximos fueron más bajos que con Z. Eran aproximadamente de 10e3 en las VRS (16C, parte superior, 1 log reducido en comparación con Z) y aproximadamente de 10e4 en las VRI (16D, parte inferior, 2 logs reducidos en comparación con Z). El vector del virus Sendai basado en Enders estaba claramente atenuado en comparación con el virus Sendai Z, no obstante, mantuvo la inmunogenicidad.

Las vacunas basadas en el virus Sendai Enders también tenían títulos considerablemente menores en comparación con una vacuna de F del RSV F basada en b/hPIV-3 después de la administración a monos verdes africanos. La vacuna de F del RSV basada en b/hPIV-3 ya está en ensayos clínicos en bebés. La vacuna de F del RSV basada en b/hPIV-3 creció hasta títulos máximos de $>10e5$ y $10e7$ en las VRS y las VRI, respectivamente, en monos verdes africanos, incluso cuando la vacuna se administró a una dosis de solo $2 \times 10e5$ (Tang *et al.* 2004 J. Virol. 78:11198).

La vacuna del virus Sendai basada en Enders suscita una respuesta inmunitaria en monos verdes africanos.

La Figura 17 muestra que la vacuna basada en el virus Sendai Enders modificado que porta el gen F del RSV en la posición F-HN (SeVc-RSVF(F-HN)) suscita una respuesta inmunitaria frente a F del RSV (A) y frente a los componentes del virus Sendai (B) en monos verdes africanos. La respuesta de anticuerpos frente a F del RSV se demostró analizando los sueros de los animales en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) aproximadamente 3 semanas después de la vacunación. Los animales de control fueron monos verdes africanos que recibieron PBS por vía intranasal e intratraqueal aproximadamente 3 semanas antes. El segundo grupo de animales recibió un virus Sendai no modificado (SeV) por las mismas vías y el tercer grupo de animales recibió la vacuna basada SeV Enders modificado que portaba el gen F del RSV F en la posición F-HN (SeVc-RSVF(F-HN)).

La vacuna basada en Sendai virus Enders modificado recombinante que expresa F del RSV (SeVc-RSVF(F-HN)) protege a monos verdes africanos frente a la infección por RSV

La Figura 18 muestra que la vacuna basada en virus Sendai Enders modificado que porta el gen F del RSV en la posición F-HN protegió completamente a los monos verdes africanos frente a la infección por RSV de las vías respiratorias inferiores. Los resultados muestran un análisis de las muestras de LBA desde los tres a diez días después de la exposición al RSV. Los animales de prueba que recibieron la vacuna basada en virus Sendai Enders modificado que porta el gen F del RSV (SeVc-RSVF(F-HN)) no presentaron virus de exposición en el LBA (verde, panel derecho B) en comparación con los animales de control de la izquierda (azul y rojo, A).

Una dosis baja de la vacuna basada en virus Sendai Enders modificado que expresa F del RSV es protectora

La Figura 19 muestra que cuando el gen F del RSV se coloca en la posición F-HN del SeV basado en Enders (SeVc-RSVF(F-HN)), también confiere protección completa frente al RSV en ratas del algodón, incluso cuando se administra a dosis tan baja como $10e2$. La actividad de la vacuna a una dosis tan baja es atractiva, tanto en términos de eficacia de la vacuna como en términos de fabricación de vacunas. Los resultados muestran los títulos del virus RSV de exposición en los pulmones tres días después de la exposición en ratas del algodón de control y vacunadas.

Por lo tanto, la vacuna para el RSV basada en SeV Enders con RSV en la posición F-HN (posiblemente también en P-M y M-F u otras posiciones) tiene crecimiento suficiente como para proteger tanto a monos verdes africanos como a ratas de algodón frente a la exposición a RSV. Las dosis de la vacuna pueden ser tan bajas como $10e2$. El virus es atenuado en monos verdes africanos, en comparación con la cepa Z del SeV y en comparación con la vacuna b/hPIV3-RSV F que se encuentra actualmente en ensayos clínicos en bebés. Se cree que la vacuna basada en SeV Enders parece ser un candidato extremadamente atractivo como vacuna no recombinante para hPIV-1 y como vacuna recombinante para cualquier otro patógeno.

II. Sistema modelo de PIV que utiliza luciferasa

Los estudios experimentales sobre la infección por hPIV en cultivos de tejidos y modelos animales han ayudado a revelar mecanismos básicos de replicación y a evaluar candidatos de vacunas preclínicas [Murphy *et al.* 2002, J Clin Invest 110: 21-27; Moscona, A. 2005, J Clin Invest 115: 1688-1698; y Schaap-Nutt *et al.* 2010, Vaccine 28: 2788-2798]. Sin embargo, ser capaz de visualizar la propagación de la infección por PIV en animales vivos individuales que son totalmente susceptibles a la enfermedad asociada al PIV permitiría investigaciones más exhaustivas sobre la patogénesis del PIV, las interacciones virus-hospedador y la transmisión de virus. La colocación de un gen marcador en la estructura del virus Sendai puede ayudar al estudio del crecimiento del virus, el emplazamiento del virus y la transmisión del virus tanto *in vivo* como *in vitro*.

Como demostración del sistema marcador, se colocó el gen de la luciferasa en diversas posiciones dentro del vector del virus Sendai modificado. La Figura 9 muestra la estrategia. En referencia a la Figura 9, en el panel A se muestran secuencias dentro de un plásmido de clonación pGEM3 diseñado técnicamente para contener sitios de restricción *NotI* flanqueantes, el gen indicador luciferasa de luciérnaga, secuencias de finalización génicas y de iniciación génicas. Para insertar el casete del gen indicador de luciferasa en tres uniones génicas (panel B), se clonaron tres plásmidos del genoma del pSeV para que contengan un sitio de restricción *NotI* único en cada una de las uniones génicas P-M, M-F y F-HN. Para el plásmido del genoma pSeV-luc(M-F*), la señal de iniciación subóptima de origen natural AGGGATAAAG (SEQ ID NO: 19) se mutó además a la señal de iniciación más eficaz AGGGTGAAAG (SEQ ID NO: 20) para compensar la atenuación esperada debida a la adición del gen extraño y la unión génica adicional. El casete del gen de la luciferasa de luciérnaga (panel a) se subclonó a partir del plásmido pGEM3 en los plásmidos del genoma de pSeV usando los sitios de restricción *NotI*. El panel C muestra el diseño de plásmidos de ADNc de pSeV para el rescate de los SeV de TS y recombinantes que contienen el gen indicador luciferasa (luc). Se muestran

los emplazamientos de los genes del virus Sendai nucleoproteína (N), polimerasa (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína Large (grande) (L), así como el promotor de la ARN polimerasa de T7 (T7) y la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (ribo). Las secuencias de iniciación génicas se muestran en verde y la secuencia de iniciación génica de origen natural subóptima AGGGATAAAG (SEQ ID NO: 19) entre los genes M y F del virus Sendai de TS se muestran en amarillo. Las secuencias de finalización génicas se muestran en rojo. La secuencia líder 3' cadena arriba del gen N y la secuencia remolque 5' cadena abajo del gen L no se muestran por simplicidad.

Los virus rescatados que expresan el gen de la luciferasa pueden administrarse a ratones y rastrearse durante una evolución temporal prolongada. Las vías respiratorias superiores e inferiores se puede controlar de esta manera. La obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva de la infección por virus Sendai en las vías respiratorias de los ratones vivos se muestra en la Figura 2. Se inocularon ratones de ocho semanas de edad por vía intranasal con 7.000 UFP de SeVc-luc(P-M), SeVc-luc(F-HN) o SeVc-luc(M-F*). Cada 24 horas, se les inyectó a los ratones sustrato de luciferina por vía intraperitoneal, se anestesiaron con isoflurano, se obtuvieron imágenes con un dispositivo Xenogen Lumina y después se dejó que se recuperaran. En referencia a la Figura 2, en un experimento, se muestra la bioluminiscencia el día 2 (panel a) o el día 7 (panel b) posinfección (p.i.) para ratones 129/SvJ infectados con SeVc-luc (PM), SeVc-luc(F-HN) o SeVc-luc(M-F*). En un segundo experimento, se muestra la bioluminiscencia en el día 2 (panel c) o el día 7 (panel d) para ratones 129/SvJ, DBA/2, BALB/c o C57BL/6 infectados con SeVc-luc(M-F*). Los datos se presentan como radiación, una medida de intensidad de bioluminiscencia, en una escala logarítmica de arco iris. Los valores de radiación van de 1×10^6 (azul) a 1×10^9 (rojo) fotones/s/cm²/estereorradián. Los círculos rojos muestran las regiones de interés (RDI) para calcular el flujo total (fotones/s) en la nasofaringe y los rectángulos rojos muestran las áreas de RDI para la tráquea y los pulmones. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que la metodología también puede sustentar (i) estudios de crecimiento de virus *in vitro*, (ii) estudios de virus en múltiples cepas de ratones (iii) estudios de transmisión de virus entre animales, (iv) estudios de dosificación de virus, (v) estudios de volúmenes de vacunas y (vi) estudios de adyuvantes (a continuación se proporcionan ejemplos). El siguiente texto describe el sistema de luciferasa con mayor detalle, enfatizando sus numerosas aplicaciones.

A. INTRODUCCIÓN

Los ratones son poco permisivos a la infección por los hPIV y la infección por hPIV en ratas del algodón, hámsteres, las cobayas y los hurones habitualmente es asintomática, con una patología mínima o indetectable en los pulmones [Karron *et al.* 2007, Parainfluenza Viruses. 5ª Ed. pág. 1497-1526]. Como resultado, una serie de estudios han utilizado la infección por el virus Sendai (SeV) en ratones como modelo para investigar la patogenia del PIV en un contexto experimental [Nagai, Y. 1999, Rev Med Virol 9: 83-99 y Faisca *et al.* 2007, Res Vet Sci 82: 115-125]. El virus Sendai es la contraparte murina del hPIV1, la causa principal de laringotraqueobronquitis (laringotraqueitis aguda pediátrica) [Denny *et al.* 1983, Pediatrics 71: 871-876]. El virus Sendai y el hPIV1 tienen el 78 % de identidad de secuencia de aminoácidos [Takimoto *et al.* 2005, Viral Immunol 18: 255-266], suscitan inmunidad protectora cruzada [Dave *et al.* 1994, Virology 199: 376-383; Hurwitz *et al.* 1997, Vaccine 15: 533-540; y Sangster *et al.* 1995, Virology 207: 287-291] y comparten similitudes epidemiológicas y de tropismo de tejidos [Karron *et al.* 2007, Parainfluenza Viruses. 5ª Ed. pág. 1497-1526 y Faisca *et al.* 2007, Res Vet Sci 82: 115-125]. Además, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que el virus Sendai se muestra prometedor como una vacuna jennériana para el hPIV1 [Slobod *et al.* 2004, Vaccine 22: 3182-3186] y como vector para el hRSV (RSV humano), hPIV3 y hPIV2 [Jones *et al.* 2009, Vaccine 27: 1848-1857; Zhan *et al.* 2007, Vaccine 25: 8782-8793; y Zhan *et al.* 2008, Vaccine 26: 3480-3488].

A pesar de que el virus Sendai y los hPIV se aislaron por primera vez en la década de cincuenta y se estudiaron durante más de 50 años [Karron *et al.* 2007, Parainfluenza Viruses. 5ª Ed. pág. 1497-1526], los aspectos fundamentales de la infección y la inmunidad del PIV siguen siendo desconocidos, aunque influirían directamente sobre la comprensión de la patogenia y la transmisión del PIV, así como en el desarrollo de medidas de control. Por ejemplo, la propagación espacial y temporal de la infección natural en las vías respiratorias después de la transmisión del virus Sendai sigue siendo desconocida debido a que los experimentos clásicos que miden los títulos de virus de ratones sacrificados estaban limitados por la gran variabilidad y error entre los animales, lo que da como resultado en resultados ambiguos [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 y van der Veen *et al.* 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246]. Tampoco se sabe cómo la transmisión del virus hPIV y el Sendai a menudo da como resultado inmunidad sin provocar una patología grave a su hospedador natural. La contribución de la infección de las VRI a la transmisión es desconocida. Finalmente, aunque la infección en los pulmones y la respuesta del hospedador simultánea están claramente asociadas con la gravedad de la enfermedad [Karron *et al.* 2007, Parainfluenza Viruses. 5ª Ed. pág. 1497-1526; Faisca *et al.* 2007, Res Vet Sci 82: 115-125; Hall, CB 2001, N Engl J Med 344: 1917-1928; y Henrickson, KJ 2003, Clin Microbiol Rev 16: 242-264], aún quedan muchas preguntas acerca de la contribución de la infección en las VRS y la tráquea con respecto al resultado clínico y la inmunidad protectora [Sealy *et al.* 2010, Vaccine 28: 6749-6756 y Rudraraju *et al.* 2011, Virology 410: 429-436]. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que no hay estudios publicados que investiguen cómo la dosis de inóculo del virus, la competencia replicativa del virus o la susceptibilidad genética del hospedador influye en el crecimiento y eliminación del virus Sendai en las VRS y la tráquea.

Por lo tanto, la presente divulgación contempla aspectos para medir *in vivo* la dinámica de la infección por el PIV y la inmunidad en animales vivos. Por lo tanto, se generaron tres SeV que expresan luciferasa para la obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva en ratones. Se ha informado anteriormente sobre sistemas análogos para ADN y virus de ARN de polaridad positiva [Luker *et al.* 2008, Antiviral Res 78: 179-187] pero hasta ahora han sido elusivos para los virus de ARN de polaridad negativa, debido en gran medida a la atenuación de los virus [Hasan *et al.* 1997, J Gen Virol 78 (Pt 11): 2813-2820] o la inestabilidad genética resultante de la inserción del gen informador [Manicassamy *et al.* 2010, Proc Natl Acad Sci USA 107: 11531-11536]. Se cree que el virus Sendai es un candidato ideal para la obtención de imágenes no invasivas debido a que (i) la expresión de genes extraños mediante vectores de paramixovirus es habitualmente genéticamente estable [Bukreyev *et al.* 2006, J Virol 80: 10293-10306], (ii) se ha demostrado de forma satisfactoria la obtención de imágenes *in vivo* de un virus Sendai no replicativo en ratones intactos [Griesenbach *et al.* 2008, Biomaterials 29: 1533-1540] y (iii) la concordancia del virus Sendai y el hospedador murino permitiría estudios de patogenia [Faisca *et al.* 2007, Res Vet Sci 82: 115-125]. Para los estudios de patogenia y de transmisión descritos en el presente documento, se diseñó técnicamente el virus indicador SeVc-luc(M-F*), el cual expresa altos niveles de luciferasa, y sin embargo se replica, y provoca enfermedad en ratones de forma similar al virus de tipo silvestre (TS). Se obtuvieron imágenes de la dinámica *in vivo* de la infección por virus Sendai en ratones vivos intactos, después de la inoculación directa y después de la transmisión por contacto en función de la dosis del virus y la cepa del ratón. Inesperadamente, se descubrió un tropismo de tejido dicotómico en el cual las VRS y la tráquea sustentaban un crecimiento robusto del virus, una transmisión eficaz y una inmunidad protectora incluso en condiciones que daban lugar a una pequeña infección en los pulmones. En su conjunto, el sistema de obtención de imágenes por bioluminiscencia y las diferencias en el tropismo de tejido en la infección por PIV proporcionan un modelo para comprender la infección y transmisión *in vivo* por paramixovirus respiratorios, y un medio para direccionar terapias antivíricas y dirigir vacunas vivas sobre una base de especificidad de tejido.

B. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivo celular. Se cultivaron cultivos en monocapa de células LLC-MK2 en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina al 1 %, penicilina al 1 % y estreptomycin al 1 % a 37 °C + CO₂ al 5 %.

II. Virus Sendai recombinantes. Se clonaron sitios únicos de reconocimiento *NotI* en las uniones intergénicas P-M, M-F y F-HN de un plásmido del genoma viral pSeV basado en Enders, utilizando sitios de clonación descritos anteriormente [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38]. El gen de luciferasa de luciérnaga se amplificó por PCR usando el vector pGL3 Basic (Promega) y una pareja de cebadores etiquetados con *Ascl*, se subclonó en un plásmido lanzadera que contenía una unión intergénica del virus Sendai y sitios de restricción *NotI* flanqueantes [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38] y después se subclonó en el único sitio *NotI* de cada uno de los plásmidos de genoma vírico pSeV. Dentro del plásmido pSeV-luc(M-F), la señal de iniciación cadena arriba de la proteína F se cambió de AGGGATAAAG (SEQ ID NO: 19) a AGGGTGAAG (SEQ ID NO: 20) utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange™ (Stratagene Corp). Los SeV recombinantes se rescataron a partir de los plásmidos del genoma pSeV como se describió anteriormente [Zhan *et al.* 2008, Vaccine 26: 3480-3488]. El genoma de Sendai de la cepa de Enders modificado consiste en un gen L del virus Sendai modificado que contiene los siguientes cambios de aminoácidos: S a G en la posición 155, R a K en la posición 258, G a E en la posición 466, G a E en la posición 482, S a R en la posición 581, Q a R en la posición 717, T a I en la posición 800 y R a K en la posición 852.

III. Expresión de luciferasa *in vitro*. Las células LLC-MK2 infectadas con SeV (MOI 5 UFP/célula) se incubaron a 33 °C + CO₂ al 5 %, y los lisados se recogieron en diversos momentos p.i. Los ensayos de luciferasa se realizaron usando el Luciferase Assay System (Promega) y los niveles de expresión se midieron usando un luminómetro automatizado (Turner Biosystems, Inc.), como se describió anteriormente [Luque *et al.* 2007, J Virol 81: 3130-3141].

IV. Títulos víricos y obtención de imágenes por bioluminiscencia. Los títulos de virus a partir de curvas de crecimiento de múltiples etapas (MOI de 0,01 UFP/célula) y de tejidos homogeneizados se determinaron mediante titulación por placas en células LLC-MK2, como se describió anteriormente [Luque *et al.* 2010, J Virol 84: 810-821]. Se anestesiaron ratones hembra 129x1/SvJ o ratones BALB/c (Jackson Laboratories) de ocho semanas de edad usando isoflurano (Baxter Health Care Corporation) y se inocularon por vía intranasal (i.n.) con 30 µl de PBS o de virus. Para las Figuras 1D, 1E, 2, 3, 4E, 4F y 12, a los 3 d antes de la inoculación con PBS o virus, los ratones se anestesiaron mediante inyección IP de 300 µl de avertina (concentración de 300 mg/kg) y el pelaje del pecho se eliminó mediante afeitado y aplicación de una crema depilatoria. Se controló la pérdida de peso, la morbilidad y la mortalidad de los ratones de forma diaria. Antes de la obtención de imágenes, se les inyectó a los ratones por vía intraperitoneal luciferina (Xenogen Corp) a una dosis de 150 mg/kg de peso corporal y se anestesiaron con isoflurano durante 5 minutos. Las imágenes *in vivo* se adquirieron con el sistema de cámara IVIS CCD (Caliper Life Sciences) y se analizaron con el programa informático Living Image 3.2 (Caliper Life Sciences) utilizando una exposición de 60 s, 30 s o 5 s (agrupamiento de 4 y una apertura de diafragma de 1). Las imágenes de pseudocolor (representativas de la bioluminiscencia) de los ratones se presentan utilizando un agrupamiento de 4 en una escala colorimétrica que varía de 1x10⁶ a 1x10⁹ de radiación superficial (fotones/s/cm²/estereorradián), que se define como el número de fotones que dejan un cm² de tejido e irradian en

un ángulo sólido de un estereorradián. Para cuantificar la bioluminiscencia, las regiones de interés (RDI) se definieron de forma a manual y los datos representados en un gráfico se expresan como flujo total (fotones/s), que se define como la radiación en cada píxel sumada sobre el área RDI (cm^2) $\times 4\pi$. Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de cuidado y uso de animales del Hospital de Investigación Infantil St. Jude y se realizaron de acuerdo con las políticas institucionales pertinentes, las directrices de la Asociación para la acreditación del cuidado de animales de laboratorio, las normativas de los Institutos Nacionales de Salud y las leyes locales, estatales y federales.

V. Inmunología. Se recogieron sueros de LLBA de animales sacrificados el día 10 o el día 60 p.i. Las muestras de LLBA (3 ml) se centrifugaron para recoger el material celular y se colocaron en una placa de cultivo de tejidos durante 1 h a 37 °C para eliminar las células adherentes. Las células en suspensión se recogieron, los linfocitos totales se recontaron al microscopio y los glóbulos rojos se lisaron. Para el análisis por citometría de flujo, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 conjugados con FITC (RM4-4) y anti-CD8b conjugados con PE (53-5.8) (BD Biosciences Pharmingen). Los linfocitos se clasificaron a base de la dispersión directa y la lateral, y los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ se midieron dentro de este portal. Se usaron ELISA para medir los niveles de anticuerpos específicos para virus Sendai o específicos para luciferasa presentes en los sueros. Resumiendo, se recubrieron placas de 96 pocillos durante una noche con virus Sendai purificado roto (10 $\mu\text{g/ml}$) o con luciferasa de luciérnaga (1 $\mu\text{g/ml}$, Abcam). Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % y después se incubaron con muestras de suero diluidas en serie con base 10. Después de la incubación, las placas se lavan, se incuban con anti-IgG de ratón HRP de cabra (Southern Biotechnologies) y después se lavan adicionalmente. Para cuantificar los niveles de anticuerpos, se añadió sustrato TMB (Kirkegaard y Perry Laboratories) a los pocillos, seguido de solución de detención, y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Para calcular los títulos de anticuerpos se usó el programa informático GraphPad Prism de regresión no lineal.

VI. Transmisión por contacto. Los animales donantes se inocularon por vía intranasal con 30 μl de SeVc-luc(M-F*) y a las 24 h p.i se colocaron de forma individual en jaulas que contenían 3 ratones de contacto sin tratamiento previo. La bioluminiscencia se controló de forma diaria hasta que los niveles de luminiscencia estuvieron de forma consistente en niveles de fondo (~15 días). Los sueros se recogieron el día 60, de modo que los niveles de anticuerpos específicos para el virus Sendai pudieran medirse, tal como se describe anteriormente. En el día 63, los ratones se expusieron a 7000 UFP de SeVc-luc(M-F*) administradas por vía intranasal y se midió la bioluminiscencia de forma diaria.

C. Materiales y métodos complementarios

I. Expresión *in vitro* de proteínas del virus Sendai. Los niveles de expresión de proteína viral se analizaron por radioinmunoprecipitación como se informó anteriormente [Luque *et al.* 2007, J Virol 81: 3130-3141 y Luque *et al.* 2010, J Virol 84: 810-821]. Resumiendo, se infectaron células LLC-MK2 a una MOI de 5 UFP/célula, se marcaron con 50 μCi [^{50}S] Promix (Amersham Pharmacia Biotech), se lisaron con tampón RIPA enfriado en hielo y se clarificaron mediante centrifugación. El sobrenadante se incubó durante una noche a 4 °C con anticuerpos monoclonales anti-NP, P, M, F y HN de ratón y los complejos inmunitarios se adsorbieron a proteína G-Sepharose (GE Healthcare) antes del fraccionamiento en geles PAGE-SDS bis-Tris al 12 % NuPAGE (Invitrogen) y de la visualización como se describe anteriormente [Luque *et al.* 2010, J Virol 84: 810-821].

II. Composición del virus Sendai. Se inocularon con virus las cavidades alantoideas de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad. El líquido alantoideo se recogió 72 hpi y se centrifugó 45 min a 3000 rpm para eliminar los desechos celulares. Los sobrenadantes se colocaron en capas sobre un gradiente de sacarosa del 60-20 % y se centrifugaron a 24.000 rpm durante 3,5 horas para aislar viriones. Los viriones aislados se diluyeron en tampón TNE y se purificaron adicionalmente en un colchón de sacarosa al 20 % mediante centrifugación a 24.000 rpm durante 15 horas. Los sedimentos de virus se resuspendieron en tampón RIPA y las concentraciones de proteínas totales se determinaron usando el kit de ensayo de proteínas de BCA (Thermo Sci.). Se corrieron niveles de proteína equivalentes en un gel SDS-PAGE al 4-12 %, el gel se tiñó usando el colorante de proteínas Blue BANDit™ (Amresco) y después se secó con un secador de geles BioRad a 60 °C durante 45 minutos.

III. Infección y transmisión *in vivo*. La medición de la afluencia de linfocitos T en el LLBA para linfocitos T CD4+ y CD8+ se describe en el texto principal. Los ELISA específicos para luciferasa se realizaron esencialmente como ELISA específicos para el virus Sendai, como se describe en el texto principal, excepto que se utilizó proteína luciferasa de luciérnaga (Abcam) para recubrir placas de 96 pocillos. La obtención de imágenes de bioluminiscencia y las determinaciones de títulos víricos a partir de tejidos disecados también se describen en el texto principal. En los experimentos de transmisión por contacto, el tiempo hasta la detección se midió como el primer día que se registró bioluminiscencia $> 10^6 \log_{10}$ fotones/s. Las áreas bajo la curva (ABC) para la bioluminiscencia se calcularon integrando las intensidades de bioluminiscencia con respecto al tiempo usando el programa informático IgorPro (Wavemetrics).

D. RESULTADOS

I. Propiedades *in vitro* de los virus que expresan luciferasa

5 Para desarrollar un modelo en el cual la infección por PIV pueda visualizarse de forma no invasiva en ratones intactos, se generaron tres virus Sendai recombinantes (virus SeVc) en los cuales se insertó la luciferasa de luciérnaga en las uniones génicas P-M, M-F y F-HN del virus Sendai (Figura 1a, Figura 9).

10 Se esperaba que la inserción de un gen adicional y una unión génica en el genoma del virus Sendai disminuyera la expresión génica del virus cadena abajo y, por consiguiente, redujera la replicación del virus [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38]. Para generar un virus Sendai que exprese la luciferasa que se espera que sufra poca o ninguna atenuación, se construyó el virus SeVc-luc(M-F*) para que contenga tanto el gen indicador de luciferasa como la secuencia de iniciación de la transcripción más eficaz AGGGTCAAAG (SEQ ID NO: 20) cadena arriba del gen F (Figura 9). Por lo tanto, los efectos de atenuación de la inserción del gen indicador podrían contrarrestarse
15 mediante la optimización de la secuencia de iniciación génica naturalmente ineficaz cadena arriba del gen F [Kato *et al.* 1999, J Virol 73: 9237-9246]. Para las construcciones SeVc-luc(P-M) y SeVc-luc(F-HN) en las cuales el gen de la luciferasa se insertó en las uniones génicas P-M y F-HN, respectivamente, se dejó intacta la secuencia de iniciación de la transcripción subóptima de origen natural cadena arriba del gen F (Figura 9).

20 Para determinar si los virus se atenuaron o eran virus limitados por temperatura, se midieron curvas de crecimiento de múltiples etapas con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 UFP/célula en células LLC-MK2 a 33 y 37 °C (Figura 1b). Los títulos del SeVc-luc(M-F*), el SeVc-luc(F-HN) y el TS fueron similares a ambas temperaturas y similares entre sí, mostrando que estos dos virus que expresan luciferasa no se atenuaron sustancialmente ni eran virus limitados por temperatura. Por el contrario, a 33 °C el virus SeVc-luc(P-M) tuvo una cinética de crecimiento
25 reducida y creció aún más lentamente a 37 °C. Para determinar qué tan eficazmente los virus SeVc expresaban el gen indicador, se midió *in vitro* la expresión de la luciferasa en lisados de células LLC-MK2 (MOI 5 UFP/célula) con un luminómetro (Figura 1c). La inserción cadena arriba del gen indicador en SeVc-luc(P-M) dio como resultado una mayor expresión del gen indicador que la inserción cadena abajo en SeVc-luc(F-HN), como se ha descrito anteriormente para inserciones de fosfatasa alcalina secretada [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38]. La
30 expresión de la luciferasa por parte de SeVc-luc(M-F*) superó a la de SeVc-luc(P-M) al cabo de las 6 h p.i. (posinfección), mostrando que en el virus M-F* la secuencia de iniciación génica potenciada diseñada técnicamente (Figura 9) aumenta la transcripción del gen indicador en los puntos de tiempo posteriores, quizás debido a una mayor transcripción cadena abajo del gen de la polimerasa L. Para determinar cómo las inserciones del gen indicador pueden haber alterado la expresión de los genes del virus Sendai, se midió mediante
35 radioinmuno precipitación la expresión de proteínas del virus Sendai en células LLC-MK2 (MOI 5 UFP/célula). Los niveles bajos de expresión de las proteínas M, F, HN y presumiblemente L por parte del virus SeVc-luc(P-M) (Figura 10a) muy probablemente provocaron el alto nivel de atenuación de esta construcción del virus. La expresión de proteínas víricas por parte de SeVc-luc(M-F*) y SeVc-luc(F-HN) fue suficiente para generar viriones con composiciones de tipo TS (Figura 10b,c), y estos dos virus indicadores crecieron *in vitro* a niveles similares a los del
40 virus del tipo salvaje.

II. Virulencia de los virus que expresan luciferasa

45 Un virus indicador de luciferasa ideal para estudios de obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva y de la patogenia, expresaría altos niveles de luciferasa sin modificar la replicación del virus y la gravedad de la enfermedad en el hospedador murino natural, en comparación con el virus de TS. Para determinar si los tres virus SeVc que expresan luciferasa generados aquí, conservan la virulencia del virus Sendai de TS *in vivo*, se inocularon ratones 129/SvJ con 7.000 UFP de virus por vía intranasal, una dosis conocida por inducir niveles sustanciales de morbilidad y mortalidad en esta cepa de ratón [Faisca *et al.* 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L777-787]. En este experimento, se anestesió con isoflurano a los ratones y se les inoculó virus por vía intranasal en un volumen de 30 µl, un método de inoculación que suministra ~ 1/3 del volumen a la nasofaringe y ~ 1/2 del volumen a los pulmones [Southam *et al.* 2002, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: L833-839]. La infección con el TS, el SeVc-luc(M-F*) y el SeVc-luc(F-HN) dio como resultado pérdidas de peso promedio de ~ el 25 % y tasas de mortalidad del 80 % (Figura 1d, e), mostrando que estos dos virus que expresan luciferasa se mantuvieron
50 completamente virulentos a esta dosis. Por el contrario, el virus SeVc-luc(P-M) atenuado indujo solo un el 12 % de pérdida de peso y no indujo mortalidad. La infección de ratones 129/SvJ con 70.000 o 700.000 UFP de SeVc-luc(P-M) también dio como resultado una supervivencia del 100 % (datos no mostrados), demostrando adicionalmente que el virus atenuado SeVc-luc(P-M) no es virulento.

60 La neumonía vírica aguda por virus Sendai induce altos niveles de infiltración de linfocitos en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) con un pico a ~ 10 dpi [Mo *et al.* 1995, J Virol 69: 1288-1291]. Para determinar si los virus que expresan la luciferasa estimulan una afluencia de linfocitos comparable al TS, los ratones 129/SvJ infectados con 7.000 UFP se sacrificaron a los 10 dpi para la recuperación de LLBA. De forma similar, se detectaron en LLBA altos números de linfocitos totales, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ después de la infección con el TS, el SeVc-luc(M-F*) y el SeVc-luc(F-HN), mientras que la afluencia de linfocitos después de la infección con el SeVc-luc(P-M) atenuado se redujo ~ 10 veces (Figura 1f; Figuras 11a-b). Para determinar las gados en que los virus indicadores
65

suscitaron anticuerpos que se unen al virus Sendai o a la luciferasa, los sueros también se recogieron a los 10 dpi. Los tres virus SeVc suscitaron títulos de anticuerpos anti-virus Sendai similares al TS (Figura 1g). Los títulos de los anticuerpos anti-luciferasa también fueron similares entre sí para los tres virus indicadores (Figura 11c). Por lo tanto, a pesar de ser atenuado y no virulento en ratones 129/SvJ, SeVc-luc(P-M) suscitó una respuesta robusta de anticuerpos. SeVc-luc(M-F*) indujo niveles de morbilidad y mortalidad como los del TS, aunque expresaba altos niveles de luciferasa, lo que lo hace el más adecuado como sustituto del virus de TS en experimentos de obtención de imágenes por bioluminiscencia en la patogenia y la transmisión.

III. Dinámica de la infección en animales vivos

Para determinar si la bioluminiscencia no invasiva reflejaba con precisión la infección *in vivo*, se inocularon ratones 129/SvJ con 7.000 UFP por vía intranasal, se obtuvieron imágenes con un instrumento Xenogen IVIS, y se sacrificaron inmediatamente para poder recoger tejidos respiratorios para la medición *ex vivo* de la luminiscencia y de los títulos víricos. De acuerdo con estudios previos en ratones inmunocompetentes [Tashiro *et al.* 1988, Virology 165: 577-583 y Miyamae *et al.* 2005, J Vet Med Sci 67: 369-377], los títulos víricos y la bioluminiscencia se limitaron a las vías respiratorias y, en estos estudios, se visualizaron claramente en la nasofaringe, la tráquea y los pulmones. Como se muestra en la Figura 12, las intensidades de bioluminiscencia *in vivo* en animales vivos se correlacionaron bien con la luminiscencia *ex vivo* (R^2 0,878) y los títulos víricos en la nasofaringe (R^2 0,864), la tráquea (R^2 0,915) y los pulmones (R^2 0,961), validando la técnica como un medio para medir la infección *in vivo* de forma no invasiva. Para determinar si los genes indicadores de luciferasa eran genéticamente estables en los tres virus SeVc, se recuperaron tejidos pulmonares de los ratones 129/SvJ inoculados con 7.000 UFP a los 7 dpi, se homogeneizaron y se plaqueó en células LLC-MK2. Se recogieron cinco placas para cada uno de los tres virus que expresan luciferasa, se transcribieron por RT-PCR y se secuenciaron. Ninguna de las placas individuales contenía el inserto de luciferasa, no tenían mutaciones y expresaron luciferasa después de la infección en células LLC-MK2. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que esto muestra que el gen indicador de luciferasa era genéticamente estable en los tres virus SeVc después de 7 días de replicación *in vivo*.

Usando el sistema de obtención de imágenes de bioluminiscencia presentado en el presente documento, se midieron la cinética y el tropismo de la infección en ratones 129/SvJ intactos y se compararon los resultados de los inventores con el método convencional de determinación del título de virus de tejidos diseccionados (Figuras 2 y 3). Al igual que el SeVc-luc(M-F*) y el SeVc-luc(F-HN) tenían tasas de replicación *in vitro* y patogenicidades *in vivo* similares al TS, estos virus SeVc también tenían títulos como los del WT en los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones. En los cornetes nasales, se detectaron títulos de virus altos ($>10^5$ UFP) a los 2 dpi y se mantuvieron hasta los 9 dpi, después de lo cual se produjo una eliminación rápida (Figura 3b). De forma similar, se observaron altos niveles de bioluminiscencia de la nasofaringe ($>10^8$ fotones/s) para los ratones 129/SvJ infectados con SeVc-luc(M-F*) entre 2 y 9 dpi, con un pico de alrededor de 5 dpi (Figura 3a). En los pulmones, los títulos de virus alcanzaron un máximo a los 5 dpi y se eliminaron hasta niveles bajos a los 9 dpi. La infección con SeVc-luc(PM) atenuado dio como resultado títulos máximos en pulmón de $\sim 10^4$ UFP a los 5 dpi, casi 100 veces menor que el TS (Figura 3d) y, de forma similar, niveles de bioluminiscencia bajos en los pulmones (Figura 3a), en consonancia con su fenotipo atenuado y no virulento. Sin embargo, SeVc-luc(PM) creció a títulos máximos altos ($\sim 10^5$ UFP) en los cornetes nasales, un nivel similar al TS a los 7 dpi (Figura 3c) y tenía altos niveles de bioluminiscencia en la nasofaringe entre los 3 y 6 dpi (Figura 3a).

IV. Tropismo tisular y dosis vírica

Aunque se sabe que dosis de inoculación más bajas del virus Sendai reducen la infección y la patología en los pulmones, los inventores no conocen ningún estudio publicado sobre la dependencia de la dosis de la infección en las VRS o la tráquea. Los estudios preliminares mostraron que la dosis infecciosa en ratón 50 (DIR_{50}) para SeVc-luc(MF*) era de 9 UFP y que una dosis de 70 UFP dio como resultado el 100 % de infección, similar a los resultados obtenidos para el virus Sendai de TS en ratones [Kiyotani *et al.* 1993, J Virol 67: 7618-7622] y el hPIV1 en seres humanos [Reichelderfer *et al.* 1958, Science 128: 779-780]. Se inocularon ratones 129/SvJ por vía intranasal con 70, 700 o 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) en volúmenes iguales de 30 μ l y después se midieron la bioluminiscencia y los títulos víricos. En comparación con una dosis de 7.000 PFU, la inoculación de 70 UFP dio como resultado títulos víricos y una bioluminiscencia en los pulmones ~ 10 veces menores (Figura 4a, b), y una menor pérdida de peso (Figura 4c). Por el contrario, la infección en la nasofaringe y la tráquea después de la inoculación de 70 UFP solo se retrasó ~ 1 d en comparación con 7.000 UFP, alcanzando un nivel similar de ~ 5 dpi (Figura 4a, b) e induciendo títulos relativamente altos de anticuerpos específicos para el virus Sendai ($> 10^5$) (Figura 4d). Por lo tanto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que la inoculación a dosis bajas de SeVc-luc(MF*) similar al TS dio como resultado una infección sesgada a las VRS y la tráquea, induciendo una respuesta de anticuerpos robusta sin provocar una patogenia grave.

V. Tropismo tisular y genética del hospedador

Diversas cepas de ratones endogámicos recombinantes difieren en sus susceptibilidades a la infección pulmonar por el virus Sendai [Faisca *et al.* 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L777-787; Brownstein, DG 1987, J Virol 61: 1670-1671; Brownstein *et al.* 1981, Am J Pathol 105: 156-163; y Brownstein *et al.* 1986, Lab Anim Sci 36: 126-

129]. Por ejemplo, los ratones 129/SvJ y DBA/2 son altamente susceptibles a la infección pulmonar y su patogenia resultante, mientras que los ratones BALB/c y C57BL/6 son altamente resistentes. No se ha informado anteriormente cómo la genética del hospedador afecta la replicación del virus Sendai en las VRS y la tráquea. Por lo tanto, la dinámica *in vivo* de la infección por el virus Sendai se midió en las cepas ratones 129/SvJ, DBA/2, C57BL/6 y BALB/c, inoculados por vía intranasal con 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*). Como se esperaba a partir de estudios anteriores, el grado de infección en los pulmones y la pérdida de peso se correlacionaron entre sí y siguieron la tendencia C57BL/6 < BALB/c << DBA/2 < 129/SvJ (Figuras 2 y 4). Por el contrario, las VRS y la tráquea fueron altamente permisivas para la infección por virus Sendai, con niveles de bioluminiscencia similares para las cuatro cepas de ratones. Por lo tanto, las VRS y la tráquea de los ratones BALB/c y C57BL/6 fueron altamente permisivas para la infección por virus Sendai a pesar de la resistencia genética en los pulmones. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que estos resultados muestran que la susceptibilidad genética a la infección por virus Sendai es específica de tejido y que la infección reducida en los pulmones no se debe a una menor infección en las VRS o la tráquea. En experimentos posteriores de transmisión se usaron cepas de ratones BALB/c y 129/SvJ con pelaje claro. Por lo tanto, se midieron los títulos del virus Sendai en grupos de ratones BALB/c sacrificados y se descubrió que los títulos *ex vivo* se correlacionan con la bioluminiscencia en ratones intactos (Figura 13a), de la misma forma que para los ratones 129/SvJ. Comparado con ratones 129/SvJ, la infección en los pulmones de ratones BALB/c disminuyó al menos 10 veces, medida por bioluminiscencia (Figura 4e) y por los títulos víricos (Figura 13b-c). Por consiguiente, los ratones BALB/c solo tenían síntomas clínicos muy leves, incluyendo muy poca pérdida de peso (Figura 4f). Por el contrario, la infección nasofaríngea en ratones BALB/c alcanzó un nivel similar al de los ratones 129/SvJ a los 3 dpi, medido por bioluminiscencia (Figura 4e) y por el título vírico (Figura 13b-c). En su conjunto, se cree que los estudios de obtención de imágenes por bioluminiscencia revelaron tres condiciones en las que se observó una infección robusta en las VRS y la tráquea, a pesar de una infección reducida en los pulmones y de la poca pérdida de peso aparente: un virus atenuado, una dosis baja de virus y una cepa resistente de ratón.

VI. Dinámica de la infección durante la transmisión por contacto

El control de la infección precisa una comprensión de cómo se transmiten los patógenos. Se sabe que el virus Sendai, los hPIV y hRSV se transmiten principalmente a través del contacto con secreciones respiratorias, a diferencia de la transmisión a larga distancia de aerosoles de partículas pequeñas [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75; van der Veen *et al.* 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246; Henrickson, K.J. 2003, Clin Microbiol Rev 16: 242-264; Hall *et al.* 1981, J Pediatr 99: 100-103; y McLean *et al.* 1967, Can Med Assoc J 96: 1449-1453]. Además se sabe que el crecimiento del virus Sendai [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75] y del virus de la gripe [Lowen *et al.* 2007, PLoS Pathog 3: 1470-1476] en las VRS estimula la transmisión. Dos antiguas preguntas fundamentales acerca de la transmisión del PIV, que permanecieron desconocidas, fueron (i) cómo el crecimiento del virus en los pulmones de los donantes influye en la transmisión y (ii) qué factores determinan la temporización de la transmisión y la propagación de la infección específica de tejido después de la transmisión. Para abordar estas preguntas fundamentales acerca de la transmisión del PIV, se inocularon ratones donantes BALB/c y 129/SvJ con 70 o 7.000 UFP de SeVc-luc(MF*) y después se colocaron, a 1 dpi, 3 ratones de contacto sin tratamiento previo en una jaula con 1 ratón donante. La bioluminiscencia se midió diariamente en los ratones inoculados y los de contacto, hasta que se eliminó la infección primaria, se recogieron sueros en el día 60, el día 63 se expusieron los ratones a 7.000 UFP de SeVc-luc(MF*) y después se obtuvieron imágenes de los ratones diariamente para observar la reinfección (Figura 5). Se cree que se observó, por bioluminiscencia nasofaríngea y seroconversión, transmisión a cada ratón de contacto sin tratamiento previo, incluso para los ratones BALB/c resistentes expuestos a animales donantes inoculados con la dosis más baja. La temporización de la transmisión no estaba afectada por el grado de infección pulmonar en los donantes, dado que los títulos en pulmón eran ~10 veces menores en los ratones donantes BALB/c frente a los 129/SvJ después de la inoculación de 7.000 UFP (Figura-13c), aunque los tiempos de transmisión (diferencia en el tiempo hasta la detección en animales inoculados frente a los animales sometidos a transmisión) fueron similares, de 3,3 y 3,4 días, respectivamente (Figuras 6f). La infección de las VRS se produjo en ambas cepas de ratones y puede contribuir a la transmisión. No obstante, el principal determinante de la transmisión parece ser el desprendimiento de virus en las VRS y la tráquea. Por ejemplo, el desprendimiento de alto título (> 10⁵ PFU) en las cavidades nasales y la tráquea de los ratones donantes 129/SvJ (Fig 4a, b) y la transmisión por contacto (Figura 6e,f) se produjeron ambos ~ 1 día antes, después de la inoculación de 7.000 UFP, en comparación con 70 UFP. En su conjunto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que estos resultados demuestran cómo los animales que sufren poca pérdida de peso aparente tienen la capacidad de estimular una transmisión eficaz de la cepa de Enders del virus Sendai.

Para investigar la magnitud de la infección por virus Sendai después de la transmisión, estudios anteriores midieron los títulos *ex vivo* en grupos de ratones de contacto sacrificados en distintos momentos después de la exposición a compañeros de jaula infectados [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 y van der Veen *et al.* 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246]. Estos estudios clásicos produjeron resultados muy ambiguos en los cuales los títulos variaban 100 veces de un día a otro y la progresión de la infección en las vías respiratorias después de la transmisión no era clara. Por lo tanto, se usó la obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva para medir por primera vez la propagación temporal y espacial de la infección por PIV a través de las vías respiratorias en ratones vivos individuales después de la transmisión. La dosis inoculada se varió en los donantes y en la cepa de ratón, de forma que se pudieron investigar los determinantes víricos y del hospedador de la transmisión. En las

cuatro condiciones analizadas (ratones 129/SvJ o BALB/c infectados con 70 o 7.000 UFP), después de la transmisión el tropismo y la magnitud de la infección en los animales de contacto fueron similares a los observados después de la inoculación directa con una dosis de 70 UFP de SeVc-luc(MF*) suministrada por vía intranasal. Después de la transmisión, la bioluminiscencia se observó en primer lugar en la nasofaringe y luego se propagó a la tráquea y los pulmones un promedio de 0,8 y 1,0 días más tarde, respectivamente (Figura 14a-d). Se observó una infección robusta en la nasofaringe y la tráquea (Fig 6a-d, Fig 14e-h), y los bajos niveles de infección pulmonar fueron consistentes con una poca pérdida de peso después de la transmisión (Figura 6g-h). Para los cuatro grupos de ratones, los títulos de anticuerpos específicos frente al virus Sendai en el día 60 fueron altos de forma similar ($\sim 10^6$) y los animales estaban protegidos de forma universal durante el desafío en el día 63 (Figura 5). Después de la exposición se detectó en solo 1 ratón de contacto de 30, un bajo nivel de bioluminiscencia ($< 10^6$ fotones/s) pero no pérdida de peso, el animal con el nivel más bajo de bioluminiscencia después de la infección primaria en los días 5-12 (Figura 5b, círculos negros rellenos). Dado que este animal individual también tenía el nivel más bajo de anticuerpos específicos para virus Sendai en el día 60 antes de la exposición, puede precisarse un nivel umbral de infección para la inmunidad protectora. En su conjunto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que la infección por virus Sendai después de la transmisión se observó como suficientemente robusta en las VRS y la tráquea, aunque limitada en los pulmones, para inducir inmunidad protectora sin provocar una pérdida de peso significativa en el hospedador murino compatible que es susceptible a la infección por el virus Sendai.

E. DISCUSIÓN

La enseñanza actual proporciona la generación y el uso de virus indicadores de luciferasa para estudiar por primera vez la cinética de la infección por PIV en ratones vivos, después de la inoculación directa y después de la transmisión por contacto. En comparación con el virus Sendai de TS, el virus SeVc-luc(M-F*) que expresa luciferasa tiene una tasa de replicación similar *in vivo* y suscita niveles similares de pérdida de peso, mortalidad, afluencia de linfocitos en LLBA y títulos de anticuerpos séricos. Las cepas de ratones susceptible (129/Sv) y resistente (BALB/c) se infectaron por vía intranasal con dosis de SeVc-luc(MF*) de 70 y 7.000 UFP y la propagación de la infección se midió mediante bioluminiscencia en ratones intactos y títulos de virus *ex vivo* de animales sacrificados. Se descubrió que las consecuencias de la infección en las VRS y la tráquea son distintas de la infección en los pulmones. Inesperadamente, en todas las condiciones evaluadas, incluyendo la inoculación de 70 UFP en ratones resistentes BALB/c, las VRS y la tráquea sustentaron el crecimiento robusto del virus Sendai, la transmisión por contacto eficaz y la inmunidad protectora, independientemente de la extensión de la infección en los pulmones. Por el contrario, la extensión de la infección en los pulmones varió según la dosis del virus y la cepa del ratón, y también se correlacionó altamente con la pérdida de peso y la mortalidad. En su conjunto, los resultados informados aquí revelan una dicotomía específica de tejido en las vías respiratorias, en la cual la infección asintomática en las VRS y la tráquea sustentan una transmisión eficaz, mientras que el grado de infección y la respuesta del hospedador en los pulmones determinan el resultado clínico.

Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, la presente divulgación contempla por primera vez el desarrollo de un sistema de obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasivo para visualizar la infección en animales vivos por un virus ARN de polaridad negativa, usando el virus prototipo de los paramixovirus respiratorios Sendai. El desarrollo de un paramixovirus no atenuado que expresa niveles suficientemente altos de un gen indicador para la obtención no invasiva de imágenes en animales pequeños ha sido un desafío debido a que estos virus de ARN de polaridad negativa no segmentados tienen un mecanismo de transcripción polarizado [Lamb *et al.* 2007, Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. 5ª Ed. pág. 1449-1496]. Un avance significativo descrito aquí es la generación del virus SeVc-luc(M-F*), en el cual se espera que los efectos atenuantes de la inserción del gen indicador [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38] se contrarresten mediante la potenciación de la secuencia de iniciación génica subóptima, de origen natural cadena arriba del gen F [Kato *et al.* 1999, J Virol 73: 9237-9246]. La expresión del gen F, un factor de virulencia [Anderson *et al.* 2008, J Virol 82: 10510-10518 y Luque *et al.* 2010, J Virol 84: 810-821], también es regulado a la baja por hPIV1 [Bousse *et al.* 2002, J Virol 76: 8244-8251], hPIV3 [Spriggs *et al.* 1986, J Virol 59: 646-654], PIV5 [Rassa *et al.* 1998, Virology 247: 274-286], el virus del sarampión [Cattaneo *et al.* 1987, Virology 160: 523-526] el virus del moquillo canino (CDV, forma siglada de *canine distemper virus*) [Anderson *et al.* 2008, J Virol 82: 10510-10518] mediante ultratranscripción o regiones largas no traducidas.

Por lo tanto, solo para ejemplo, pero sin limitación, los aspectos de la presente descripción contemplan que puedan diseñarse técnicamente otros paramixovirus indicadores similares al TS que expresen altos niveles de luciferasa, insertando el gen indicador en la unión M-F y manteniendo la expresión del gen F a través de mutaciones compensadoras. La expresión del gen indicador sin atenuación del virus Sendai también se ha logrado mediante la construcción de un gen bicistrónico que contiene un sitio interno de entrada al ribosoma [Touzelet *et al.* 2009, Virus Res 140: 40-48], aunque todavía no está claro si este enfoque alternativo produce suficiente expresión de luciferasa para la obtención de imágenes no invasivas de la infección *in vivo*. La inserción de un gen indicador potenciado de proteína verde fluorescente (eGFP) cadena abajo en la unión H-L de un CDV no atenuado ha permitido la obtención de imágenes *ex vivo* de la propagación de paramixovirus en tejidos disecados de hurón [Rudd *et al.* 2006, J Virol 80: 9361-9370 y von Messling *et al.* 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101: 14216-14221]. Sin embargo, se espera que la inserción de un gen indicador de luciferasa cerca del extremo 5' del genoma para evitar la atenuación dé como resultado niveles relativamente bajos de expresión del gen indicador, limitando la sensibilidad de las técnicas de obtención de imágenes no invasivas, como se observó aquí con el virus indicador SeVc-luc(F-HN).

Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que el uso del gen indicador de luciferasa en el presente trabajo permitió la medición de la infección en todo el aparato respiratorio de animales intactos, de forma que la propagación y la eliminación de la infección pudieron medirse después de la inoculación o la transmisión. Por lo tanto, se espera que se pueda construir una forma alternativa de este vector de virus Sendai, en la cual se use un gen indicador distinto incluyendo, pero sin limitación, una proteína fluorescente tal como eGFP. Los virus indicadores que expresan eGFP también se han utilizado para estudiar la dinámica de la infección por CDV en hurones [Rudd *et al.* 2006, *J Virol* 80: 9361-9370 y von Messling *et al.* 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14216-14221] y la infección por virus del sarampión en monos [Lemon *et al.* 2011, *PLoS Pathog* 7: e1001263 y de Swart *et al.* 2007, *PLoS Pathog* 3: e178]. Se contempla que una ventaja del gen indicador eGFP sea que el tropismo de infección en los tejidos disecados pueda estudiarse a nivel celular. Además, los virus que expresan eGFP también se pueden usar para cuantificar y tipificar células infectadas en la sangre periférica, la piel y la boca de animales vivos. Los hPIV3 y los SeV que expresan eGFP se han utilizado para estudiar el tropismo celular de la infección por PIV en cultivos epiteliales primarios bien diferenciado. En el caso del hPIV3, se encontró que la infección estaba limitada a células epiteliales ciliadas y provocaba poca citopatología [Zhang *et al.* 2005, *J Virol* 79: 1113-1124]. Por el contrario, se descubrió que el virus Sendai infecta células ciliadas y no ciliadas, pero no células caliciformes, y se observó que induce cilioestasis, desprendimiento celular, apoptosis y degeneración celular [Villenave *et al.* 2010, *J Virol* 84: 11718-11728]. Se desconoce si está asociado con la transmisión del virus Sendai el virus libre de células o el virus asociado a células.

Sorprendentemente, aquí se encontró que las VRS son altamente permisivas a la infección por virus Sendai, incluso en condiciones que se sabe que limitan la infección en los pulmones: después de una baja dosis de virus, para un virus atenuado y en cepas de ratones resistentes. Recientemente se ha demostrado que la inoculación intranasal de RSV en sujetos humanos también da como resultado títulos nasales máximos igualmente altos para dosis de virus que extienden en un intervalo de 100 veces [Devincenzo *et al.* 2010, *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1305-1314]. Por supuesto, después de la transmisión natural del RSV o el hPIV en seres humanos, las altas dosis de inoculación de virus en los pulmones pueden desempeñar un papel en el desarrollo de una enfermedad grave, como se observó aquí para una inoculación de alta dosis altas del virus Sendai en ratones.

Por lo tanto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, los aspectos de la presente de divulgación contemplan que el virus Sendai es una vacuna jenneriana prometedora frente a hPIV1 [Karron *et al.* 2007, *Parainfluenza Viruses*. 5ª Ed. pág. 1497-1526 y Takimoto *et al.* 2005, *Viral Immunol* 18: 255-266], y los vectores de vacuna del virus Sendai recombinantes que contienen un gen de la envoltura de RSV, hPIV3 o hPIV2 insertado en la unión génica F-HN han demostrado suscitar respuestas de linfocitos B y T que conducen a la protección frente a la exposición en modelos de pequeños animales [Jones *et al.* 2009, *Vaccine* 27: 1848-1857; Zhan *et al.* 2007, *Vaccine* 25: 8782-8793; y Zhan *et al.* 2008, *Vaccine* 26: 3480-3488]. Aunque el virus Sendai es patógeno en ratones, un ensayo clínico en curso ha demostrado que el virus Sendai es bien tolerado en seres humanos [Slobod *et al.* 2004, *Vaccine* 22: 3182-3186]. En primates no humanos, se ha demostrado que el virus Sendai protege frente a la exposición a hPIV1 sin efectos secundarios asociados [Hurwitz *et al.* 1997, *Vaccine* 15: 533-540 y Skiadopoulos *et al.* 2002, *Virology* 297: 153-160]. Los resultados probablemente se deben en parte a la sensibilidad del virus Sendai a la inmunidad innata mediada por IFN humana [Bousse *et al.* 2006, *Virus Res* 121: 23-32]. Además, las realizaciones de la presente invención también contemplan que a medida que el virus Sendai se desarrolle más como vector de vacuna, los SeV que expresan luciferasa y el sistema de obtención de imágenes desarrollados aquí serán útiles para investigar cómo la dosis de vacuna, el volumen y la posición de la inserción de antígenos extraños en el genoma del virus Sendai influyen en el crecimiento del vector específico de tejido y la respuesta inmunitaria en modelos de animales pequeños. La sustitución del gen indicador de luciferasa en el virus Sendai por un antígeno de vacuna podría modificar la replicación *in vivo* del vector. Por ejemplo, se encontró que tres vectores de hPIV3 recombinantes distintos que expresan HN de hPIV1, HN de hPIV2 o HA del virus del sarampión, insertados en la unión génica P-M se replican a distintos niveles en hámsteres [Skiadopoulos *et al.* 2002, *Virology* 297: 136-152].

Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que otro hallazgo nuevo aquí fue que la eficacia y la temporización de la transmisión del virus Sendai se produjeron independientemente del grado de infección pulmonar, de los síntomas clínicos y de la genética del hospedador. También se ha observado la transmisión del hPIV1 a partir donantes humanos asintomáticos en un entorno experimental [Reichelderfer *et al.* 1958, *Science* 128: 779-780] y concuerda con las observaciones epidemiológicas de los brotes de PIV en general [Hall, CB 2001, *N Engl J Med* 344: 1917-1928 y Henrickson, KJ 2003, *Clin Microbiol Rev* 16: 242-264]. Estas observaciones sugieren que la infección de las VRI y la gravedad de los síntomas clínicos serían malos predictores del potencial de transmisión para los esfuerzos en la vigilancia y el control de infecciones. De acuerdo con un trabajo anterior [Iida, T. 1972, *J Gen Virol* 14: 69-75 y Kiyotani *et al.* 1993, *J Virol* 67: 7618-7622], se observó que la transmisión del virus Sendai coincide con el crecimiento de virus con alto título en las VRS y es notablemente eficaz debido a la alta infectividad del virus (por ejemplo, la DIR50 del virus Sendai es de < 10 UFP) hPIV1, hPIV3 y hRSV son altamente infecciosos de forma similar y también se transmiten predominantemente por contacto directo o por exposición indirecta a secreciones nasales [Hall *et al.* 1981, *J Pediatr* 99: 100-103; McLean *et al.* 1967, *Can Med Assoc J* 96: 1449-1453; Hall *et al.* 1981, *Infect Immun* 33: 779-783; Parrott *et al.* 1975, *Dev Biol Stand* 28: 389-399; y Tyrrell *et al.* 1959, *Br Med J* 2: 909-911]. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, en ausencia de un fármaco profiláctico disponible para individuos no infectados en grupos de alto riesgo (por ejemplo, bebés prematuros e los inmunodeprimidos), se cree que los resultados descritos aquí sugieren que el control de la infección del PIV se

centraría mejor en la reducción del desprendimiento de las VRS de los infectados individuos, la desinfección de superficies contaminadas y el lavado de las manos. En contraste con el control de la infección, que sería mejor si limitara la infección de las VRS, sería mejor que los antiviricos terapéuticos estuvieran dirigidos a las VRS para controlar las manifestaciones clínicas de la enfermedad asociada al PIV.

5 Se han identificado factores genéticos que modulan la susceptibilidad al virus y la gravedad de la enfermedad en seres humanos [Stephens, HA 2010, *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 99-114; Zhang *et al.* 2009, *Infect Genet Evol* 9: 1148-1157; y Arkwright *et al.* 2008, *Curr Opin Infect Dis* 21: 217-222] y en pulmones de ratones [Faisca *et al.* 2005, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L777-787; Brownstein, DG 1987, *J Virol* 61: 1670-1671; Brownstein *et al.* 1986, *Lab Anim Sci* 36: 126-129; Simon *et al.* 2009, *Infect Genet Evol* 9: 1253-1259; Boon *et al.* 2009, *J Virol* 83: 10417-10426; Anh *et al.* 2006, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L426-435; Itoh *et al.* 1991, *J Vet Med Sci* 53: 275-279; y Stark *et al.* 2002, *J Med Virol* 67: 92-100]. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que los presentes resultados muestran por primera vez que los factores genéticos que limitan el crecimiento del virus en los pulmones de ratones resistentes BALB/c, en comparación con los ratones susceptibles 129/Sv, no limitan el crecimiento robusto del virus en las VRS y la tráquea y, por consiguiente, no limitan la transmisión. Adicionalmente, de manera similar, se observaron altos grados de infección en las VRS y la tráquea y bajos niveles de infección en los pulmones después de la transmisión ya sea que los ratones BALB/c y 129/Sv se expusieran a compañeros de jaula inoculados a dosis de virus altas o bajas. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que esto demuestra que la genética del hospedador no desempeña un papel importante en la transmisión del PIV, al menos para estas cepas de ratones. Estas observaciones refuerzan la noción presentada aquí de que la transmisión y la patogenia son consecuencias independientes de la infección de las VRS frente a la de las VRI, respectivamente, y pueden contrarrestarse con la mayor eficacia mediante estrategias específicas de tejido. Se necesitan experimentos adicionales para delinear los mecanismos responsables de la alta permisividad de las VRS y la tráquea a la infección por virus Sendai en comparación con los pulmones. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se contempla que los posibles mecanismos incluyen el sitio de inoculación en la cavidad nasal, la temperatura más baja en las VRS, las diferencias específicas de tejido en la replicación del virus y la inmunidad innata, y los mecanismos antiviricos en los pulmones, tal como la presencia de proteínas tensioactivas. Un posible factor que contribuye a la reducción de la replicación en los pulmones pueden ser los niveles más bajos de triptasa de la célula de Clara secretada, que se necesita para escindir la proteína F a partir de un precursor inactivado, de forma que pueda producirse la entrada del virus [Kido *et al.* 1992, *J Biol Chem* 267: 13573-13579 y Tashiro *et al.* 1992, *J Virol* 66: 7211-7216].

La infección asintomática que estimula la inmunidad y la transmisión representa una relación equilibrada que beneficia tanto al virus como al hospedador. Tal ha sido el caso de varias epidemias enzoóticas (clínicamente no aparentes) de virus Sendai, en las cuales se mantuvieron infecciones subclínicas en colonias de ratón y hámster durante años sin el desarrollo de una mayor patogenia y solo provocando ocasionalmente enfermedad aparente en animales lactantes y viejos [Profeta *et al.* 1969, *Am J Epidemiol* 89: 316-324 y Zurcher *et al.* 1977, *Lab Anim Sci* 27: 955-962]. Dichas observaciones epidemiológicas recuerdan a la baja virulencia pero alta transmisibilidad del virus Sendai diseñado técnicamente por genética inversa descrito aquí, que se obtuvo de la cepa Enders que se había atenuado a través de numerosos ciclos de pases en huevos de gallina embrionados y que contenía modificaciones en el gen L. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que los resultados informados aquí para la cepa Enders muestran que el desprendimiento aumentado de virus en los pulmones no aumenta ni el tiempo de transmisión ni la eficacia de transmisión, por lo tanto, puede no haber una ventaja selectiva para la replicación aumentada del virus Sendai en los pulmones. En su lugar, se sugiere el siguiente mecanismo para la interacción simbiótica virus-hospedador en epidemias enzoóticas del virus Sendai: la infección natural después de la transmisión es lo suficientemente limitada en los pulmones como para evitar los signos clínicos de la enfermedad pero suficientemente robusta en la nasofaringe y la tráquea como para estimular la transmisión eficaz e inducir inmunidad protectora.

50 También se han producido brotes epizooticos (clínicamente aparentes) de virus Sendai que provocaron morbilidad y altas tasas de mortalidad en colonias de ratones [Bhatt *et al.* 1974, *Am J Epidemiol* 100: 222-229; Ishida *et al.* 1978, *Adv Virus Res* 23: 349-383; y Nakagawa *et al.* 1980, *Nippon Juigaku Zasshi* 42: 337-344]. Dos aislados de campo estrechamente relacionados, altamente patógenos del virus Sendai son las cepas Ohita y Hamamatsu [Sakaguchi *et al.* 1994, *Arch Virol* 135: 159-164 y Itoh *et al.* 1997, *J Gen Virol* 78 (Pt 12): 3207-3215]. Aunque la inoculación con solo unas pocas UFP de la cepa Hamamatsu del virus Sendai sin pases da como resultado la mortalidad en ratones, después de 50 pases en huevos el virus se atenúa hasta 400 veces en DLR₅₀ [Kiyotani *et al.* 2001, *Arch Virol* 146: 893-908]. Se descubrió que las adaptaciones a células LLC-MK2 y huevos de gallina de las cepas altamente patógenas Ohita y Hamamatsu han seleccionado mutaciones en la proteína C y en la región líder no traducida, respectivamente, que aumentan la replicación en las células en cultivo pero atenúan la replicación y la patogenia en los pulmones de los ratones [Garcin *et al.* 1997, *Virology* 238: 424-431; Fujii *et al.* 2002, *J Virol* 76: 8540-8547; y Sakaguchi *et al.* 2003, *Virology* 313: 581-587]. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que el sistema de obtención de imágenes de bioluminiscencia descrito aquí sería útil para determinar si las mutaciones que atenúan la replicación en los pulmones también atenúan la replicación en las VRS y la tráquea, reduciendo de este modo la transmisión, o si las mutaciones atenuantes en realidad estimulan la transmisión sostenida mediante el sostenimiento nasal y el desprendimiento traqueal de virus mientras se reduce la patogenia en los pulmones. Dichos experimentos también pueden revelar si las observaciones sobre la propagación del virus

Sendai y la transmisión informadas aquí para la cepa atenuada adaptada Enders al huevo se extienden a aislados de campo altamente patógenos y sin países.

5 En resumen, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que se ha descrito el desarrollo del virus indicador no atenuado SeVc-luc(MF*), que puede usarse para cuantificar la infección específica de tejido en ratones vivos, y un vector de vacuna candidato SeVc-luc(PM), que se replica preferentemente en las VRS. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se contempla que los resultados revelen cómo la infección por cepas de virus Sendai Enders se propaga en animales vivos individuales después de la inoculación directa y después de la transmisión. Un hallazgo importante nuevo fue una aparente dicotomía fenotípica de la infección en 10 las VRS y la tráquea, en comparación con los pulmones, que da como resultado un desacoplamiento observado de la patogenia y la transmisión. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que las herramientas para la obtención de imágenes desarrolladas aquí proporcionarán un método para estudiar cómo la dinámica de la infección y de la transmisión están determinadas por factores víricos, la genética del huésped, la edad del huésped, el estado inmunitario, las condiciones ambientales y el modo de inoculación. Solo para ejemplo, 15 pero sin limitación, la infección puede rastrearse de forma no invasiva en ratones de TS y genosuprimidos, antes de medir las respuestas inmunitarias *ex vivo* y después se entiendan en términos de la infección precedente. Además podría desarrollarse una estrategia similar para obtener imágenes de la infección por otros paramixovirus en modelos de pequeños animales. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, en su conjunto, las realizaciones de la presente invención contemplan el sistema modelo y los resultados, que sugieren enfoques 20 direccionados a tejidos para el control de infección y el desarrollo de vacunas para el PIV, y se espera que la técnica de obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva ayude en análisis preclínicos de candidatos de vacuna y agentes terapéuticos antivíricos.

25 III. Utilidades

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación contempla un vector de virus Sendai candidato que comprende un gen L de Enders con aminoácidos sustituidos, que puede usarse como un vector no recombinante o como un vector recombinante para expresar cualquier gen, o más de un gen, en cualquier posición. En otro aspecto, la divulgación contempla un vector de vacuna de virus Sendai candidato que es una quimera Enders/Z, tal como la que tiene un gen L de Enders/ZL modificado, que tiene la capacidad de expresar el gen F o G del RSV en la posición F-HN del genoma del virus Sendai. 30

En otro aspecto más, el gen extraño podría colocarse en la unión intergénica P-M. Además, en otros aspectos, el gen extraño contemplado por la divulgación incluye un gen o genes del hPIV tipo 1-4, en donde dicho gen (o genes) se inserta entre los genes P-M y/o F-HN. Además, en otros aspectos, la divulgación también contempla candidatos de vacuna con uno o más genes extraños de más de una fuente insertados en una o más posiciones intergénicas, de forma que podría actuarse a la vez sobre una o más enfermedades que se tienen como objetivo para suscitar una respuesta inmune dirigida. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se contempla que un vector de vacuna de SeV modificado no recombinante o recombinante puede abarcar un gen L modificado que contiene las siguientes sustituciones de aminoácidos: S155G, R258K, G466E, G482E, S581R, Q717R, T800I y R852K. Además, en un aspecto adicional, la divulgación contempla un medio visual de rastreo de la infección mediante el uso de bioluminiscencia. La presente divulgación contempla un sistema que comprende un vector de luciferasa que tiene la capacidad de obtención de imágenes de la progresión del virus y de la enfermedad patógena asociada dentro de un animal vivo, con la capacidad de investigar vectores de vacuna candidatos para su utilidad en la protección frente a enfermedades específicas. Además, en algunos aspectos, la divulgación contempla células hospedadoras para la expresión de proteínas víricas. En un ejemplo, pero sin limitación, las proteínas víricas expresadas podrían usarse como un inmunógeno para suscitar una respuesta inmunitaria de un sujeto frente a un patógeno que se tiene como objetivo o múltiples patógenos que se tienen como objetivo. Solo para ejemplo, pero sin limitación, las células hospedadoras incluyen células LLC-MK2 (véase la Figura 1). 45 50

En otros aspectos, la divulgación contempla usos terapéuticos y/o diagnósticos. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, en algunos aspectos, la presente divulgación contempla la generación de anticuerpos para su uso frente al virus modificado, proteínas víricas modificadas, incluyendo fragmentos, análogos, homólogos, péptidos y/o combinaciones de los mismos. Dichos anticuerpos podrían utilizarse, por ejemplo, dentro de un inmunoensayo de diagnóstico tal como un ELISA, RIA e inmunoprecipitación, entre otros, para la identificación/diagnóstico de una infección y/o enfermedad. La generación de anticuerpos es conocida para los expertos en la materia. Además, los procedimientos/directrices de laboratorio se pueden encontrar en *Antibodies: A Laboratory Manual* por Harlow *et al.* (1988); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* por Harlow *et al.* (1999); Kohler, G.; Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature* 256 (5517): 495. 55 60

Además, en algunos aspectos, la presente divulgación contempla el uso de anticuerpos generados como un agente terapéutico para el tratamiento frente a patógenos que se tienen como objetivo, incluido el uso de anticuerpos para el suministro de fármacos secundarios, toxinas, entre otros. Adicionalmente, se contempla que las proteínas víricas se puedan usar para una vacuna frente al virus. Los expertos en la materia conocen numerosas formulaciones de vacuna. Las vacunas se pueden administrar solas o en combinación con diversos adyuvantes/vehículos. Los expertos en la materia conocen vehículos farmacéuticos. Estos, más normalmente, serían vehículos convencionales 65

para la administración de vacunas a seres humanos, que incluyen soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Otros ingredientes incluyen excipientes, vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes y tensioactivos.

- 5 En otros aspectos, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, la presente divulgación contempla el uso de la estructura del SeVc solo o en combinación con otros genes de interés para su uso como vacuna, una herramienta de investigación, una herramienta de diagnóstico, una herramienta para la obtención de imágenes, e incluye cualquier otro uso similar, equivalentes, relacionado por parte de un experto en la materia.

10 PARTE EXPERIMENTAL

Se proporcionan los siguientes ejemplos a fines ilustrativos.

Ejemplo I

15

Cultivo celular

Se cultivaron cultivos en monocapa de células LLC-MK2 en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina al 1 %, penicilina al 1 % y estreptomycin al 1 % a 37 °C + CO₂ al 5 %.

20

Ejemplo II

Virus Sendai recombinantes

25

Se clonaron sitios únicos de reconocimiento *NotI* en las uniones intergénicas P-M, M-F y F-HN de un plásmido del genoma viral pSeV basado en Enders, utilizando sitios de clonación descritos anteriormente [Tokusumi *et al.* 2002, *Virus Res* 86: 33-38]. El gen de luciferasa de luciérnaga se amplificó por PCR usando el vector pGL3 Basic (Promega) y una pareja de cebadores etiquetados con *AsclI*, se subclonó en un plásmido lanzadera que contenía una unión intergénica del virus Sendai y sitios de restricción *NotI* flanqueantes [Tokusumi *et al.* 2002, *Virus Res* 86: 33-38] y después se subclonó en el único sitio *NotI* de cada uno de los plásmidos de genoma vírico pSeV. Dentro del plásmido pSeV-luc(M-F), la señal de iniciación cadena arriba de la proteína F se cambió de AGGGATAAAG (SEQ ID NO: 19) a AGGGTGAAAG (SEQ ID NO: 20) utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange™ (Stratagene Corp). Los SeV recombinantes se rescataron a partir de los plásmidos del genoma pSeV como se describió anteriormente [Zhan *et al.* 2008, *Vaccine* 26: 3480-3488]. El genoma de Sendai de la cepa de Enders modificado consiste en un gen L del virus Sendai modificado que contiene los siguientes cambios de aminoácidos: S a G en la posición 155, R a K en la posición 258, G a E en la posición 466, G a E en la posición 482, S a R en la posición 581, Q a R en la posición 717, T a I en la posición 800 y R a K en la posición 852.

30

35

40 Ejemplo III

Expresión de luciferasa *in vitro*

Las células LLC-MK2 infectadas con SeV (MOI 5 UFP/célula) se incubaron a 33 °C + CO₂ al 5 %, y los lisados se recogieron en diversos momentos p.i. Los ensayos de luciferasa se realizaron usando el Luciferase Assay System (Promega) y los niveles de expresión se midieron usando un luminómetro automatizado (Turner Biosystems, Inc.), como se describió anteriormente [Luque *et al.* 2007, *J Virol* 81: 3130-3141].

45

Ejemplo IV

50

Títulos víricos y obtención de imágenes por bioluminiscencia

Los títulos de virus a partir de curvas de crecimiento de múltiples etapas (MOI de 0,01 UFP/célula) y de tejidos homogeneizados se determinaron mediante titulación por placas en células LLC-MK2, como se describió anteriormente [Luque *et al.* 2010, *J Virol* 84: 810-821]. Se anestesiaron ratones hembra 129x1/SvJ o ratones BALB/c (Jackson Laboratories) de ocho semanas de edad usando isoflurano (Baxter Health Care Corporation) y se inocularon por vía intranasal (i.n.) con 30 µl de PBS o de virus. Para las Figuras 1D, 1E, 2, 3, 4E, 4F y 12, a los 3 d antes de la inoculación con PBS o virus, los ratones se anestesiaron mediante inyección IP de 300 µl de avertina (concentración de 300 mg/kg) y el pelaje del pecho se eliminó mediante afeitado y aplicación de una crema depilatoria. Se controló diariamente en los animales la pérdida de peso, la morbilidad y la mortalidad. Antes de la obtención de imágenes, se les inyectó a los ratones por vía intraperitoneal luciferina (Xenogen Corp) a una dosis de 150 mg/kg de peso corporal y se anestesiaron con isoflurano durante 5 minutos. Las imágenes *in vivo* se adquirieron con el sistema de cámara IVIS CCD (Caliper Life Sciences) y se analizaron con el programa informático Living Image 3.2 (Caliper Life Sciences) utilizando una exposición de 60 s, 30 s o 5 s (agrupamiento de 4 y una apertura de diafragma de 1). Las imágenes de pseudocolor (representativas de la bioluminiscencia) de los ratones se presentan utilizando un agrupamiento de 4 en una escala colorimétrica que varía de 1x10⁶ a 1x10⁹ de radiación superficial

55

60

65

(fotones/s/cm²/estereorradián), que se define como el número de fotones que dejan un cm² de tejido e irradian en un ángulo sólido de un estereorradián. Para cuantificar la bioluminiscencia, las regiones de interés (RDI) se definieron de forma a manual y los datos representados en un gráfico se expresan como flujo total (fotones/s), que se define como la radiación en cada píxel sumada sobre el área RDI (cm²) x 4π. Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de cuidado y uso de animales del Hospital de Investigación Infantil St. Jude y se realizaron de acuerdo con las políticas institucionales pertinentes, las directrices de la Asociación para la acreditación del cuidado de animales de laboratorio, las normativas de los Institutos Nacionales de Salud y las leyes locales, estatales y federales.

10 Ejemplo V

Inmunología

Se recogieron sueros de LLBA de animales sacrificados el día 10 o el día 60 p.i. Las muestras de LLBA (3 ml) se centrifugaron para recoger el material celular y se colocaron en una placa de cultivo de tejidos durante 1 h a 37 °C para eliminar las células adherentes. Las células en suspensión se recogieron, los linfocitos totales se recontaron al microscopio y los glóbulos rojos se lisaron. Para el análisis por citometría de flujo, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 conjugados con FITC (RM4-4) y anti-CD8b conjugados con PE (53-5.8) (BD Biosciences Pharmingen). Los linfocitos se clasificaron a base de la dispersión directa y la lateral, y los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ se midieron dentro de este portal. Se usaron ELISA para medir los niveles de anticuerpos específicos para virus Sendai o específicos para luciferasa presentes en los sueros. Resumiendo, se recubrieron placas de 96 pocillos durante una noche con virus Sendai purificado roto (10 µg/ml) o con luciferasa de luciérnaga (1 µg/ml, Abcam). Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % y después se incubaron con muestras de suero diluidas en serie con base 10. Después de la incubación, las placas se lavan, se incuban con anti-IgG de ratón HRP de cabra (Southern Biotechnologies) y después se lavan adicionalmente. Para cuantificar los niveles de anticuerpos, se añadió sustrato TMB (Kirkegaard y Perry Laboratories) a los pocillos, seguido de solución de detención, y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Para calcular los títulos de anticuerpos se usó el programa informático GraphPad Prism de regresión no lineal.

30 Ejemplo VI

Transmisión por contacto

Los animales donantes se inocularon por vía intranasal con 30 µl de SeVc-luc(M-F*) y a las 24 h p.i se colocaron de forma individual en jaulas que contenían 3 ratones de contacto sin tratamiento previo. La bioluminiscencia se controló de forma diaria hasta que los niveles de luminiscencia estuvieron de forma consistente en niveles de fondo (~15 días). Los sueros se recogieron el día 60, de modo que los niveles de anticuerpos específicos para el virus Sendai pudieran medirse, tal como se describe anteriormente. En el día 63, los ratones se expusieron a 7000 UFP de SeVc-luc(M-F*) administradas por vía intranasal y se midió la bioluminiscencia de forma diaria.

40 Ejemplo VII

Expresión *in vitro* de proteínas del virus Sendai

Los niveles de expresión de proteína viral se analizaron por radioinmunoprecipitación como se informó anteriormente [Luque *et al.* 2007, J Virol 81: 3130-3141 y Luque *et al.* 2010, J Virol 84: 810-821]. Resumiendo, se infectaron células LLC-MK2 a una MOI de 5 UFP/célula, se marcaron con 50 µCi [³⁵S] Promix (Amersham Pharmacia Biotech), se lisaron con tampón RIPA enfriado en hielo y se clarificaron mediante centrifugación. El sobrenadante se incubó durante una noche a 4 °C con anticuerpos monoclonales anti-NP, P, M, F y HN de ratón y los complejos inmunitarios se adsorbieron a proteína G-Sepharose (GE Healthcare) antes del fraccionamiento en geles PAGE-SDS bis-Tris al 12 % NuPAGE (Invitrogen) y de la visualización como se describe anteriormente [Luque *et al.* 2010, J Virol 84: 810-821].

55 Ejemplo VIII

Composición del virus Sendai

Se inocularon con virus las cavidades alantoideas de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad. El líquido alantoideo se recogió 72 hpi y se centrifugó 45 min a 3000 rpm para eliminar los desechos celulares. Los sobrenadantes se colocaron en capas sobre un gradiente de sacarosa del 60-20 % y se centrifugaron a 24.000 rpm durante 3,5 horas para aislar viriones. Los viriones aislados se diluyeron en tampón TNE y se purificaron adicionalmente en un colchón de sacarosa al 20 % mediante centrifugación a 24.000 rpm durante 15 horas. Los sedimentos de virus se resuspendieron en tampón RIPA y las concentraciones de proteínas totales se determinaron usando el kit de ensayo de proteínas de BCA (Thermo Sci.). Se corrieron niveles de proteína equivalentes en un gel SDS-PAGE al 4-12 %, el gel se tiñó usando el colorante de proteínas Blue BANDit™ (Amresco) y después se secó con un secador de geles BioRad a 60 °C durante 45 minutos.

Ejemplo IX**Infección y transmisión *in vivo***

5 La medición de la afluencia de linfocitos T en el LLBA para linfocitos T CD4+ y CD8+ se describe en el texto principal. Los ELISA específicos para luciferasa se realizaron esencialmente como ELISA específicos para el virus Sendai, como se describe en el texto principal, excepto que se utilizó proteína luciferasa de luciérnaga (Abcam) para recubrir placas de 96 pocillos. La obtención de imágenes de bioluminiscencia y las determinaciones de títulos víricos a partir de tejidos disecados también se describen en el texto principal. En los experimentos de transmisión por
10 contacto, el tiempo hasta la detección se midió como el primer día que se registró bioluminiscencia $> 10^6 \log_{10}$ foton/s. Las áreas bajo la curva (ABC) para la bioluminiscencia se calcularon integrando las intensidades de bioluminiscencia con respecto al tiempo usando el programa informático IgorPro (Wavemetrics).

Ejemplo X**Propiedades *in vitro* de los virus que expresan luciferasa**

Para desarrollar un modelo en el cual la infección por PIV pueda visualizarse de forma no invasiva en ratones intactos, se generaron tres virus Sendai recombinantes (virus SeVc) en los cuales se insertó la luciferasa de
20 luciérnaga en las uniones génicas P-M, M-F y F-HN del virus Sendai (Figura 1a, Figura 9).

Se esperaba que la inserción de un gen adicional y una unión génica en el genoma del virus Sendai disminuyera la expresión génica del virus cadena abajo y, por consiguiente, redujera la replicación del virus [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38]. Para generar un virus Sendai que exprese la luciferasa que se espera que sufra poca o
25 ninguna atenuación, se construyó el virus SeVc-luc(M-F*) para que contenga tanto el gen indicador de luciferasa como la secuencia de iniciación de la transcripción más eficaz AGGGTGAAAG (SEQ ID NO: 20) cadena arriba del gen F (Figure 9). Por lo tanto, los efectos de atenuación de la inserción del gen indicador podrían contrarrestarse mediante la optimización de la secuencia de iniciación génica naturalmente ineficaz cadena arriba del gen F [Kato *et al.* 1999, J Virol 73: 9237-9246]. Para las construcciones SeVc-luc(P-M) y SeVc-luc(F-HN) en las cuales el gen de la
30 luciferasa se insertó en las uniones génicas P-M y F-HN, respectivamente, se dejó intacta la secuencia de iniciación de la transcripción subóptima de origen natural cadena arriba del gen F (Figura S1).

Para determinar si los virus se atenuaron o eran virus limitados por temperatura, se midieron curvas de crecimiento de múltiples etapas con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 UFP/célula en células LLC-MK2 a 33 y 37 °C
35 (Figura 1b). Los títulos del SeVc-luc(M-F*), el SeVc-luc(F-HN) y el TS fueron similares a ambas temperaturas y similares entre sí, mostrando que estos dos virus que expresan luciferasa no se atenuaron sustancialmente ni eran virus limitados por temperatura. Por el contrario, a 33 °C el virus SeVc-luc(P-M) tuvo una cinética de crecimiento reducida y creció aún más lentamente a 37 °C. Para determinar qué tan eficazmente los virus SeVc expresaban el gen indicador, se midió *in vitro* la expresión de la luciferasa en lisados de células LLC-MK2 (MOI 5 UFP/célula) con
40 un luminómetro (Figura 1c). La inserción cadena arriba del gen indicador en SeVc-luc(P-M) dio como resultado una mayor expresión del gen indicador que la inserción cadena abajo en SeVc-luc(F-HN), como se ha descrito anteriormente para inserciones de fosfatasa alcalina secretada [Tokusumi *et al.* 2002, Virus Res 86: 33-38]. La expresión de la luciferasa por parte de SeVc-luc(M-F*) superó a la de SeVc-luc(P-M) al cabo de las 6 h p.i. (posinfección), mostrando que en el virus M-L* la secuencia de iniciación génica potenciada diseñada técnicamente
45 (Figura 9) aumenta la transcripción del gen indicador en los puntos de tiempo posteriores, quizás debido a una mayor transcripción cadena abajo del gen de la polimerasa L. Para determinar cómo las inserciones del gen indicador pueden haber alterado la expresión de los genes del virus Sendai, se midió mediante radioinmunoprecipitación la expresión de proteínas del virus Sendai en células LLC-MK2 (MOI 5 UFP/célula). Los niveles bajos de expresión de las proteínas M, F, HN y presumiblemente L por parte del virus SeVc-luc(P-M) (Figura
50 10a) muy probablemente provocaron el alto nivel de atenuación de esta construcción del virus. La expresión de proteínas víricas por parte de SeVc-luc(M-F*) y SeVc-luc(F-HN) fue suficiente para generar viriones con composiciones de tipo TS (Figura 10b,c), y estos dos virus indicadores crecieron *in vitro* a niveles similares a los del virus del tipo salvaje.

Ejemplo XI**Virulencia de los virus que expresan luciferasa**

Un virus indicador de luciferasa ideal para estudios de obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva y de la patogenicidad, expresaría altos niveles de luciferasa sin modificar la replicación del virus y la gravedad de la
60 enfermedad en el hospedador murino natural, en comparación con el virus de TS. Para determinar si los tres virus SeVc que expresan luciferasa generados aquí, conservan la virulencia del virus Sendai de TS *in vivo*, se inocularon ratones 129/SvJ con 7.000 UFP de virus por vía intranasal, una dosis conocida por inducir niveles sustanciales de morbilidad y mortalidad en esta cepa de ratón [Faisca *et al.* 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L777-
65 787]. En este experimento, se anestesió con isoflurano a los ratones y se les inoculó virus por vía intranasal en un volumen de 30 μ l, un método de inoculación que suministra $\sim 1/3$ del volumen a la nasofaringe y $\sim 1/2$ del volumen a

los pulmones [Southam *et al.* 2002, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L833-839]. La infección con el TS, el SeVc-luc(M-F*) y el SeVc-luc(F-HN) dio como resultado pérdidas de peso promedio de ~ el 25 % y tasas de mortalidad del 80 % (Figura 1d, e), mostrando que estos dos virus que expresan luciferasa se mantuvieron completamente virulento a esta dosis. Por el contrario, el virus SeVc-luc(P-M) atenuado indujo solo un el 12 % de pérdida de peso y no indujo mortalidad. La infección de ratones 129/SvJ con 70.000 o 700.000 UFP de SeVc-luc(P-M) también dio como resultado una supervivencia del 100 % (datos no mostrados), demostrando adicionalmente que el virus atenuado SeVc-luc(P-M) no es virulento.

La neumonía vírica aguda por virus Sendai induce altos niveles de infiltración de linfocitos en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) con un pico a ~ 10 dpi [Mo *et al.* 1995, *J Virol* 69: 1288-1291]. Para determinar si los virus que expresan la luciferasa estimulan una afluencia de linfocitos comparable al TS, los ratones 129/SvJ infectados con 7.000 UFP se sacrificaron a los 10 dpi para la recuperación de LLBA. De forma similar, se detectaron en LLBA altos números de linfocitos totales, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ después de la infección con el TS, el SeVc-luc(MF*) y el SeVc-luc(F-HN), mientras que la afluencia de linfocitos después de la infección con el SeVc-luc(PM) atenuado se redujo ~ 10 veces (Figura 1f; Figuras 11a-b). Para determinar las gados en que los virus indicadores suscitaron anticuerpos que se unen al virus Sendai o a la luciferasa, los sueros también se recogieron a los 10 dpi. Los tres virus SeVc suscitaron títulos de anticuerpos anti-virus Sendai similares al TS (Figura 1g). Los títulos de los anticuerpos anti-luciferasa también fueron similares entre sí para los tres virus indicadores (Figura 11c). Por lo tanto, a pesar de ser atenuado y no virulento en ratones 129/SvJ, SeVc-luc(P-M) suscitó una respuesta robusta de anticuerpos. SeVc-luc(M-F*) indujo niveles de morbilidad y mortalidad como los del TS, aunque expresaba altos niveles de luciferasa, lo que lo hace el más adecuado como sustituto del virus de TS en experimentos de obtención de imágenes por bioluminiscencia en la patogénesis y la transmisión.

Ejemplo XII

Dinámica de la infección en animales vivos

Para determinar si la bioluminiscencia no invasiva reflejaba con precisión la infección *in vivo*, se inocularon ratones 129/SvJ con 7.000 UFP por vía intranasal, se obtuvieron imágenes con un instrumento Xenogen IVIS, y se sacrificaron inmediatamente para poder recoger tejidos respiratorios para la medición *ex vivo* de la luminiscencia y de los títulos víricos. De acuerdo con estudios previos en ratones inmunocompetentes [Tashiro *et al.* 1988, *Virology* 165: 577-583 y Miyamae *et al.* 2005, *J Vet Med Sci* 67: 369-377], los títulos víricos y la bioluminiscencia se limitaron a las vías respiratorias y, en estos estudios, se visualizaron claramente en la nasofaringe, la tráquea y los pulmones. Como se muestra en la Figura 12, las intensidades de bioluminiscencia *in vivo* en animales vivos se correlacionaron bien con la luminiscencia *ex vivo* (R^2 0,878) y los títulos víricos en la nasofaringe (R^2 0,864), la tráquea (R^2 0,915) y los pulmones (R^2 0,961), validando la técnica como un medio para medir la infección *in vivo* de forma no invasiva. Para determinar si los genes indicadores de luciferasa eran genéticamente estables en los tres virus SeVc, se recuperaron tejidos pulmonares de los ratones 129/SvJ inoculados con 7.000 UFP a los 7 dpi, se homogeneizaron y se plaqueó en células LLC-MK2. Se recogieron cinco placas para cada uno de los tres virus que expresan luciferasa, se transcribieron por RT-PCR y se secuenciaron. Ninguna de las placas individuales contenía el inserto de luciferasa, no tenían mutaciones y expresaron luciferasa después de la infección en células LLC-MK2. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que esto muestra que el gen indicador de luciferasa era genéticamente estable en los tres virus SeVc después de 7 días de replicación *in vivo*.

Usando el sistema de obtención de imágenes de bioluminiscencia presentado en el presente documento, se midieron la cinética y el tropismo de la infección en ratones 129/SvJ intactos y se compararon los resultados de los inventores con el método convencional de determinación del título de virus de tejidos diseccionados (Figuras 2 y 3). Al igual que el SeVc-luc(M-F*) y el SeVc-luc(F-HN) tenían tasas de replicación *in vitro* y patogenicidades *in vivo* similares al TS, estos virus SeVc también tenían títulos como los del WT en los cornetes nasales, la tráquea y los pulmones. En los cornetes nasales, se detectaron títulos de virus altos ($>10^5$ UFP) a los 2 dpi y se mantuvieron hasta los 9 dpi, después de lo cual se produjo una eliminación rápida (Figura 3b). De forma similar, se observaron altos niveles de bioluminiscencia de la nasofaringe ($>10^8$ fotones/s) para los ratones 129/SvJ infectados con SeVc-luc(M-F*) entre 2 y 9 dpi, con un pico de alrededor de 5 dpi (Figura 3a). En los pulmones, los títulos de virus alcanzaron un máximo a los 5 dpi y se eliminaron hasta niveles bajos a los 9 dpi. La infección con SeVc-luc(PM) atenuado dio como resultado títulos máximos en pulmón de $\sim 10^4$ UFP a los 5 dpi, casi 100 veces menor que el TS (Figura 3d) y, de forma similar, niveles de bioluminiscencia bajos en los pulmones (Figura 3a), en consonancia con su fenotipo atenuado y no virulento. Sin embargo, SeVc-luc(PM) creció a títulos máximos altos ($\sim 10^5$ UFP) en los cornetes nasales, un nivel similar al TS a los 7 dpi (Figura 3c) y tenía altos niveles de bioluminiscencia en la nasofaringe entre los 3 y 6 dpi (Figura 3a).

Ejemplo XIII

Tropismo tisular y dosis vírica

Aunque se sabe que dosis de inoculación más bajas del virus Sendai reducen la infección y la patología en los pulmones, los inventores no conocen ningún estudio publicado sobre la dependencia de la dosis de la infección en las

VRS o la tráquea. Los estudios preliminares mostraron que la dosis infecciosa en ratón 50 (DIR50) para SeVc-luc(MF*) era de 9 UFP y que una dosis de 70 UFP dio como resultado el 100 % de infección, similar a los resultados obtenidos para el virus Sendai de TS en ratones [Kiyotani *et al.* 1993, J Virol 67: 7618-7622] y el hPIV1 en seres humanos [Reichelderfer *et al.* 1958, Science 128: 779-780]. Se inocularon ratones 129/SvJ por vía intranasal con 70, 700 o 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*) en volúmenes iguales de 30 µl y después se midieron la bioluminiscencia y los títulos víricos. En comparación con una dosis de 7.000 PFU, la inoculación de 70 UFP dio como resultado títulos víricos y una bioluminiscencia en los pulmones ~10 veces menores (Figura 4a, b), y una menor pérdida de peso (Figura 4c). Por el contrario, la infección en la nasofaringe y la tráquea después de la inoculación de 70 UFP solo se retrasó ~1 d en comparación con 7.000 UFP, alcanzando un nivel similar de ~ 5 dpi (Figura 4a, b) e induciendo títulos relativamente altos de anticuerpos específicos para el virus Sendai ($> 10^5$) (Figura 4d). Por lo tanto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que la inoculación a dosis bajas de SeVc-luc(MF*) similar al TS dio como resultado una infección sesgada a las VRS y la tráquea, induciendo una respuesta de anticuerpos robusta sin provocar una patología grave.

15 Ejemplo XIV

Tropismo tisular y genética del hospedador

Diversas cepas de ratones endogámicos recombinantes difieren en sus susceptibilidades a la infección pulmonar por el virus Sendai [Faisca *et al.* 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L777-787; Brownstein, DG 1987, J Virol 61: 1670-1671; Brownstein *et al.* 1981, Am J Pathol 105: 156-163; y Brownstein *et al.* 1986, Lab Anim Sci 36: 126-129]. Por ejemplo, los ratones 129/SvJ y DBA/2 son altamente susceptibles a la infección pulmonar y su patología resultante, mientras que los ratones BALB/c y C57BL/6 son altamente resistentes. No se ha informado anteriormente cómo la genética del hospedador afecta la replicación del virus Sendai en las VRS y la tráquea. Por lo tanto, la dinámica *in vivo* de la infección por el virus Sendai se midió en las cepas ratones 129/SvJ, DBA/2, C57BL/6 y BALB/c, inoculados por vía intranasal con 7.000 UFP de SeVc-luc(M-F*). Como se esperaba a partir de estudios anteriores, el grado de infección en los pulmones y la pérdida de peso se correlacionaron entre sí y siguieron la tendencia C57BL/6 < BALB/c << DBA/2 < 129/SvJ (Figuras 2 y 4). Por el contrario, las VRS y la tráquea fueron altamente permisivas para la infección por virus Sendai, con niveles de bioluminiscencia similares para las cuatro cepas de ratones. Por lo tanto, las VRS y la tráquea de los ratones BALB/c y C57BL/6 fueron altamente permisivas para la infección por virus Sendai a pesar de la resistencia genética en los pulmones. Si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que estos resultados muestran que la susceptibilidad genética a la infección por virus Sendai es específica de tejido y que la infección reducida en los pulmones no se debe a una menor infección en las VRS o la tráquea. En experimentos posteriores de transmisión se usaron cepas de ratones BALB/c y 129/SvJ con pelaje claro. Por lo tanto, se midieron los títulos del virus Sendai en grupos de ratones BALB/c sacrificados y se descubrió que los títulos *ex vivo* se correlacionan con la bioluminiscencia en ratones intactos (Figura 13a), de la misma forma que para los ratones 129/SvJ. Comparado con ratones 129/SvJ, la infección en los pulmones de ratones BALB/c disminuyó al menos 10 veces, medida por bioluminiscencia (Figura 4e) y por los títulos víricos (Figura 13b-c). Por consiguiente, los ratones BALB/c solo tenían síntomas clínicos muy leves, incluyendo muy poca pérdida de peso (Figura 4f). Por el contrario, la infección nasofaríngea en ratones BALB/c alcanzó un nivel similar al de los ratones 129/SvJ a los 3 dpi, medido por bioluminiscencia (Figura 4e) y por el título vírico (Figura 13b-c). En su conjunto, se cree que los estudios de obtención de imágenes por bioluminiscencia revelaron tres condiciones en las que se observó una infección robusta en las VRS y la tráquea, a pesar de una infección reducida en los pulmones y de la poca pérdida de peso aparente: un virus atenuado, una dosis baja de virus y una cepa resistente de ratón.

Ejemplo XV

Dinámica de la infección durante la transmisión por contacto

El control de la infección precisa una comprensión de cómo se transmiten los patógenos. Se sabe que el virus Sendai, los hPIV y hRSV se transmiten principalmente a través del contacto con secreciones respiratorias, a diferencia de la transmisión a larga distancia de aerosoles de partículas pequeñas [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75; van der Veen *et al.* 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246; Henrickson, KJ 2003, Clin Microbiol Rev 16: 242-264; Hall *et al.* 1981, J Pediatr 99: 100-103; y McLean *et al.* 1967, Can Med Assoc J 96: 1449-1453]. Además se sabe que el crecimiento del virus Sendai [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75] y del virus de la gripe [Lowen *et al.* 2007, PLoS Pathog 3: 1470-1476] en las VRS estimula la transmisión. Dos antiguas preguntas fundamentales acerca de la transmisión del PIV, que permanecieron desconocidas, fueron (i) cómo el crecimiento del virus en los pulmones de los donantes influye en la transmisión y (ii) qué factores determinan la temporización de la transmisión y la propagación de la infección específica de tejido después de la transmisión. Para abordar estas preguntas fundamentales acerca de la transmisión del PIV, se inocularon ratones donantes BALB/c y 129/SvJ con 70 o 7.000 UFP de SeVc-luc(MF*) y después se colocaron, a 1 dpi, 3 ratones de contacto sin tratamiento previo en una jaula con 1 ratón donante. La bioluminiscencia se midió diariamente en los ratones inoculados y los de contacto, hasta que se eliminó la infección primaria, se recogieron sueros en el día 60, el día 63 se expusieron los ratones a 7.000 UFP de SeVc-luc(MF*) y después se obtuvieron imágenes de los ratones diariamente para observar la reinfección (Figura 5). Se cree que se observó, por bioluminiscencia nasofaríngea y seroconversión, transmisión a

cada ratón de contacto sin tratamiento previo, incluso para los ratones BALB/c resistentes expuestos a animales donantes inoculados con la dosis más baja. La temporización de la transmisión no estaba afectada por el grado de infección pulmonar en los donantes, dado que los títulos en pulmón eran ~10 veces menores en los ratones donantes BALB/c frente a los 129/SvJ después de la inoculación de 7.000 UFP (Figura 13c), aunque los tiempos de transmisión (diferencia en el tiempo hasta la detección en animales inoculados frente a los animales sometidos a transmisión) fueron similares, de 3,3 y 3,4 días, respectivamente (Figuras 6f). La infección de las VRS se produjo en ambas cepas de ratones y puede contribuir a la transmisión. No obstante, el principal determinante de la transmisión parece ser el desprendimiento de virus en las VRS y la tráquea. Por ejemplo, el desprendimiento de alto título ($> 10^5$ PFU) en las cavidades nasales y la tráquea de los ratones donantes 129/SvJ (Fig 4a, b) y la transmisión por contacto (Figura 6e,f) se produjeron ambos ~ 1 día antes, después de la inoculación de 7.000 UFP, en comparación con 70 UFP. En su conjunto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que estos resultados demuestran cómo los animales que sufren poca pérdida de peso aparente tienen la capacidad de estimular una transmisión eficaz de la cepa de Enders del virus Sendai.

Para investigar la magnitud de la infección por virus Sendai después de la transmisión, estudios anteriores midieron los títulos *ex vivo* en grupos de ratones de contacto sacrificados en distintos momentos después de la exposición a compañeros de jaula infectados [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 y van der Veen *et al.* 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246]. Estos estudios clásicos produjeron resultados muy ambiguos en los cuales los títulos variaban 100 veces de un día a otro y la progresión de la infección en las vías respiratorias después de la transmisión no era clara. Por lo tanto, se usó la obtención de imágenes por bioluminiscencia no invasiva para medir por primera vez la propagación temporal y espacial de la infección por PIV a través de las vías respiratorias en ratones vivos individuales después de la transmisión. La dosis inoculada se varió en los donantes y en la cepa de ratón, de forma que se pudieron investigar los determinantes víricos y del hospedador de la transmisión. En las cuatro condiciones analizadas (ratones 129/SvJ o BALB/c infectados con 70 o 7.000 UFP), después de la transmisión el tropismo y la magnitud de la infección en los animales de contacto fueron similares a los observados después de la inoculación directa con una dosis de 70 UFP de SeVc-luc(MF*) suministrada por vía intranasal. Después de la transmisión, la bioluminiscencia se observó en primer lugar en la nasofaringe y luego se propagó a la tráquea y los pulmones un promedio de 0,8 y 1,0 días más tarde, respectivamente (Figura 14a-d). Se observó una infección robusta en la nasofaringe y la tráquea (Fig 6a-d, Fig 14e-h), y los bajos niveles de infección pulmonar fueron consistentes con una poca pérdida de peso después de la transmisión (Figura 6g-h). Para los cuatro grupos de ratones, los títulos de anticuerpos específicos frente al virus Sendai en el día 60 fueron altos de forma similar ($\sim 10^6$) y los animales estaban protegidos de forma universal durante el desafío en el día 63 (Figura 5). Después de la exposición se detectó en solo 1 ratón de contacto de 30, un bajo nivel de bioluminiscencia ($< 10^6$ fotones/s) pero no pérdida de peso, el animal con el nivel más bajo de bioluminiscencia después de la infección primaria en los días 5-12 (Figura 5b, círculos negros rellenos). Dado que este animal individual también tenía el nivel más bajo de anticuerpos específicos para virus Sendai en el día 60 antes de la exposición, puede precisarse un nivel umbral de infección para la inmunidad protectora. En su conjunto, si bien no es necesario entender el mecanismo de acción, se cree que la infección por virus Sendai después de la transmisión se observó como suficientemente robusta en las VRS y la tráquea, aunque limitada en los pulmones, para inducir inmunidad protectora sin provocar una pérdida de peso significativa en el hospedador murino compatible que es susceptible a la infección por el virus Sendai.

REFERENCIAS

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y dispositivos descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la materia. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferentes específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en las áreas de desarrollo de vacunas, enfermedades infecciosas, biología molecular, el diagnóstico, la biotecnología y/o campos relacionados, estén destinados a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Karron RA, Collins PL, editores (2007) Parainfluenza Viruses. 5 ed. Filadelfia: Lippincott, Williams and Wilkins. 1497-1526 p.

Lamb RA, Parks GD, editores (2007) *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. 5 ed. Filadelfia: Lippincott, Williams and Wilkins. 1449-1496 p.

Williams JV, Edwards KM, Weinberg GA, Griffin MR, Hall CB, *et al.* (2010) Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children. J Infect Dis 201: 1890-1898.

Chanock RM, Parrott RH, Johnson KM, Kapikian AZ, Bell JA (1963) Myxoviruses: Parainfluenza. Am Rev Respir Dis 88: S152-S166.

Parrott RH, Vargosko AJ, Kimhw, Bell JA, Chanock RM (1962) Acute respiratory diseases of viral etiology. III. parainfluenza. Myxoviruses. Am J Public Health Nations Health 52: 907-917.

- Parrott RH, Vargosko A, Luckey A, Kim HW, Cumming C, et al. (1959) Clinical features of infection with hemadsorption viruses. *N Engl J Med* 260: 731-738.
- 5 Murphy BR, Collins PL (2002) Live-attenuated virus vaccines for respiratory syncytial and parainfluenza viruses: applications of reverse genetics. *J Clin Invest* 110: 21-27.
- Moscona A (2005) Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J Clin Invest* 115: 1688-1698.
- 10 Schaap-Nutt A, Scull MA, Schmidt AC, Murphy BR, Pickles RJ (2010) Growth restriction of an experimental live attenuated human parainfluenza virus type 2 vaccine in human ciliated airway epithelium *in vitro* parallels attenuation in African green monkeys. *Vaccine* 28: 2788-2798.
- 15 Nagai Y (1999) Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev Med Virol* 9: 83-99.
- Faisca P, Desmecht D (2007) Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci* 82: 115-125.
- 20 Denny FW, Murphy TF, Clyde WA, Jr., Collier AM, Henderson FW (1983) Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71: 871-876.
- Takimoto T, Hurwitz JL, Zhan X, Krishnamurthy S, Prouser C, et al. (2005) Recombinant Sendai virus as a novel vaccine candidate for respiratory syncytial virus. *Viral Immunol* 18: 255-266.
- 25 Dave VP, Allan JE, Slobod KS, Smith FS, Ryan KW, et al. (1994) Viral cross-reactivity and antigenic determinants recognized by human parainfluenza virus type 1-specific cytotoxic T-cells. *Virology* 199: 376-383.
- 30 Hurwitz JL, Soike KF, Sangster MY, Portner A, Sealy RE, et al. (1997) Intranasal Sendai virus vaccine protects African green monkeys from infection with human parainfluenza virus-type one. *Vaccine* 15: 533-540.
- Sangster M, Hyland L, Sealy R, Coleclough C (1995) Distinctive kinetics of the antibody-forming cell response to Sendai virus infection of mice in different anatomical compartments. *Virology* 207: 287-291.
- 35 Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, Allison K, Brown B, et al. (2004) Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine* 22: 3182-3186.
- Jones B, Zhan X, Mishin V, Slobod KS, Surman S, et al. (2009) Human PIV-2 recombinant Sendai virus (rSeV) elicits durable immunity and combines with two additional SeVc viruses to protect against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV. *Vaccine* 27: 1848-1857.
- 40 Zhan X, Hurwitz JL, Krishnamurthy S, Takimoto T, Boyd K, et al. (2007) Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. *Vaccine* 25: 8782-8793.
- 45 Zhan X, Slobod KS, Krishnamurthy S, Luque LE, Takimoto T, et al. (2008) Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections. *Vaccine* 26: 3480-3488.
- 50 Iida T (1972) Experimental study on the transmission of Sendai virus in specific pathogen-free mice. *J Gen Virol* 14: 69-75.
- van der Veen J, Poort Y, Birchfield DJ (1970) Experimental transmission of Sendai virus infection in mice. *Arch Gesamte Virusforsch* 31: 237-246.
- 55 Hall CB (2001) Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 344: 1917-1928.
- Henrickson KJ (2003) Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16: 242-264.
- 60 Sealy R, Jones BG, Surman SL, Hurwitz JL (2010) Robust IgA and IgG-producing antibody forming cells in the diffuse-NALT and lungs of Sendai virus-vaccinated cotton rats associate with rapid protection against human parainfluenza virus-type 1. *Vaccine* 28: 6749-6756. Rudraraju R, Surman S, Jones B, Sealy R, Woodland DL, et al. (2011) Phenotypes and functions of persistent Sendai virus-induced antibody forming cells and CD8+ T cells in diffuse nasal-associated lymphoid tissue typify lymphocyte responses of the gut. *Virology* 410: 429-436.
- 65

- Luker KE, Luker GD (2008) Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. *Antiviral Res* 78: 179-187.
- 5 Hasan MK, Kato A, Shioda T, Sakai Y, Yu D, *et al.* (1997) Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J Gen Virol* 78 (Pt 11): 2813-2820.
- Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, *et al.* (2010) Analysis of *in vivo* dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11531-11536.
- 10 Bukreyev A, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL (2006) Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *J Virol* 80: 10293-10306.
- Griesenbach U, Meng C, Farley R, Cheng SH, Scheule RK, *et al.* (2008) *In vivo* imaging of gene transfer to the respiratory tract. *Biomaterials* 29: 1533-1540.
- 15 Tokusumi T, Iida A, Hirata T, Kato A, Nagai Y, *et al.* (2002) Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res* 86: 33-38.
- 20 Kato A, Kiyotani K, Hasan MK, Shioda T, Sakai Y, *et al.* (1999) Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J Virol* 73: 9237-9246.
- Faisca P, Anh DB, Desmecht DJ (2005) Sendai virus-induced alterations in lung structure/function correlate with viral loads and reveal a wide resistance/susceptibility spectrum among mouse strains. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L777-787.
- 25 Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD (2002) Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L833-839.
- 30 Mo XY, Sarawar SR, Doherty PC (1995) Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *J Virol* 69: 1288-1291.
- Tashiro M, Pritzer E, Khoshnan MA, Yamakawa M, Kuroda K, *et al.* (1988) Characterization of a pantropic variant of Sendai virus derived from a host range mutant. *Virology* 165: 577-583.
- 35 Miyamae T (2005) Differential invasion by Sendai virus of abdominal parenchymal organs and brain tissues in cortisone- and cyclophosphamide-based immunosuppressed mice. *J Vet Med Sci* 67: 369-377.
- Kiyotani K, Sakaguchi T, Fujii Y, Yoshida T (1993) FO-containing noninfectious Sendai virus can initiate replication in mouse lungs but requires a relatively long incubation period. *J Virol* 67: 7618-7622.
- 40 Reichelderfer TE, Chanock RM, Craighead JE, Huebner RJ, Turner HC, *et al.* (1958) Infection of human volunteers with type 2 hemadsorption virus. *Science* 128: 779-780.
- 45 Brownstein DG (1987) Resistance/susceptibility to lethal Sendai virus infection genetically linked to a mucociliary transport polymorphism. *J Virol* 61: 1670-1671.
- Brownstein DG, Smith AL, Johnson EA (1981) Sendai virus infection in genetically resistant and susceptible mice. *Am J Pathol* 105: 156-163.
- 50 Brownstein DG, Winkler S (1986) Genetic resistance to lethal Sendai virus pneumonia: virus replication and interferon production in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Lab Anim Sci* 36: 126-129.
- Hall CB, Douglas RG, Jr. (1981) Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 99: 100-103.
- 55 McLean DM, Bannatyne RM, Givan KF (1967) Myxovirus dissemination by air. *Can Med Assoc J* 96: 1449-1453.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P (2007) Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 3: 1470-1476.
- 60 Profeta ML, Lief FS, Plotkin SA (1969) Enzootic sendai infection in laboratory hamsters. *Am J Epidemiol* 89: 316-324.
- Zurcher C, Burek JD, Van Nunen MC, Meihuizen SP (1977) A naturally occurring epizootic caused by Sendai virus in breeding and aging rodent colonies. I. Infection in the mouse. *Lab Anim Sci* 27: 955-962.
- 65

- Anderson DE, von Messling V (2008) Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol* 82: 10510-10518.
- 5 Luque LE, Bridges OA, Mason JN, Boyd KL, Portner A, *et al.* (2010) Residues in the heptad repeat A region of the fusion protein modulate the virulence of Sendai virus in mice. *J Virol* 84: 810-821.
- 10 Bousse T, Matrosovich T, Portner A, Kato A, Nagai Y, *et al.* (2002) The long noncoding region of the human parainfluenza virus type 1 f gene contributes to the read-through transcription at the m-f gene junction. *J Virol* 76: 8244-8251.
- 15 Spriggs MK, Collins PL (1986) Human parainfluenza virus type 3: messenger RNAs, polypeptide coding assignments, intergenic sequences, and genetic map. *J Virol* 59: 646-654. Rassa JC, Parks GD (1998) Molecular basis for naturally occurring elevated readthrough transcription across the M-F junction of the paramyxovirus SV5. *Virology* 247: 274-286.
- 20 Cattaneo R, Rebmann G, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA (1987) Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160: 523-526.
- Touzelet O, Loukili N, Pelet T, Fairley D, Curran J, *et al.* (2009) De novo generation of a non-segmented negative strand RNA virus with a bicistronic gene. *Virus Res* 140: 40-48.
- 25 Rudd PA, Cattaneo R, von Messling V (2006) Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol* 80: 9361-9370.
- von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R (2004) Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14216-14221.
- 30 Lemon K, de Vries RD, Mesman AW, McQuaid S, van Amerongen G, *et al.* (2011) Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog* 7: e1001263.
- de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, *et al.* (2007) Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3: e178.
- 35 Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, Watson B, Peeples ME, *et al.* (2005) Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an *in vitro* model of human airway epithelium. *J Virol* 79: 1113-1124.
- Villenave R, Touzelet O, Thavagnanam S, Sarlang S, Parker J, *et al.* (2010) Cytopathogenesis of Sendai virus in well-differentiated primary pediatric bronchial epithelial cells. *J Virol* 84: 11718-11728.
- 40 Devincenzo JP, Wilkinson T, Vaishnav A, Cehelsky J, Meyers R, *et al.* (2010) Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1305-1314.
- 45 Skiadopoulos MH, Surman SR, Riggs JM, Elkins WR, St Claire M, *et al.* (2002) Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology* 297: 153-160.
- Bousse T, Chambers RL, Scroggs RA, Portner A, Takimoto T (2006) Human parainfluenza virus type 1 but not Sendai virus replicates in human respiratory cells despite IFN treatment. *Virus Res* 121: 23-32.
- 50 Skiadopoulos MH, Surman SR, Riggs JM, Orvell C, Collins PL, *et al.* (2002) Evaluation of the replication and immunogenicity of recombinant human parainfluenza virus type 3 vectors expressing up to three foreign glycoproteins. *Virology* 297: 136-152.
- 55 Hall CB, Douglas RG, Jr., Schnabel KC, Geiman JM (1981) Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect Immun* 33: 779-783.
- Parrott RH, Kim HW, Brandt CD, Chanock RM (1975) Potential of attenuated respiratory syncytial virus vaccine for infants and children. *Dev Biol Stand* 28: 389-399.
- 60 Tyrrell DA, Bynoe ML, Petersen KB, Sutton RN, Pereira MS (1959) Inoculation of human volunteers with parainfluenza viruses types 1 and 3 (HA 2 and HA 1). *Br Med J* 2: 909-911.
- 65 Stephens HA (2010) HLA and other gene associations with dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 99-114.

- Zhang L, Katz JM, Gwinn M, Dowling NF, Khoury MJ (2009) Systems-based candidate genes for human response to influenza infection. *Infect Genet Evol* 9: 1148-1157.
- 5 Arkwright PD, Abinun M (2008) Recently identified factors predisposing children to infectious diseases. *Curr Opin Infect Dis* 21: 217-222.
- Simon AY, Moritoh K, Torigoe D, Asano A, Sasaki N, *et al.* (2009) Multigenic control of resistance to Sendai virus infection in mice. *Infect Genet Evol* 9: 1253-1259.
- 10 Boon AC, deBeauchamp J, Hollmann A, Luke J, Kotb M, *et al.* (2009) Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice. *J Virol* 83: 10417-10426.
- Anh DB, Faisca P, Desmecht DJ (2006) Differential resistance/susceptibility patterns to pneumovirus infection among inbred mouse strains. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L426-435.
- 15 Itoh T, Iwai H, Ueda K (1991) Comparative lung pathology of inbred strain of mice resistant and susceptible to Sendai virus infection. *J Vet Med Sci* 53: 275-279.
- Stark JM, McDowell SA, Koenigsnecht V, Prows DR, Leikauf JE, *et al.* (2002) Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus infection in inbred mice. *J Med Virol* 67: 92-100.
- 20 Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, *et al.* (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 267: 13573-13579.
- 25 Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, *et al.* (1992) Trypsin-like protease Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* 66: 7211-7216.
- Bhatt PN, Jonas AM (1974) An epizootic of Sendai infection with mortality in a barrier-maintained mouse colony. *Am J Epidemiol* 100: 222-229.
- 30 Ishida N, Homma M (1978) Sendai virus. *Adv Virus Res* 23: 349-383.
- Nakagawa M, Saito M, Kinoshita K, Suzuki E, Imaizumi K (1980) Pathogenicity of Sendai virus in mice caged with infectors and their offsprings. *Nippon Juigaku Zasshi* 42: 337-344.
- 35 Sakaguchi T, Kiyotani K, Sakaki M, Fujii Y, Yoshida T (1994) A field isolate of Sendai virus: its high virulence to mice and genetic divergence from prototype strains. *Arch Virol* 135: 159-164.
- 40 Itoh M, Isegawa Y, Hotta H, Homma M (1997) Isolation of an avirulent mutant of Sendai virus with two amino acid mutations from a highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* 78 (Pt 12): 3207-3215.
- 45 Kiyotani K, Sakaguchi T, Fujii Y, Yoshida T (2001) Attenuation of a field Sendai virus isolate through egg-passages is associated with an impediment of viral genome replication in mouse respiratory cells. *Arch Virol* 146: 893-908.
- Garcin D, Itoh M, Kolakofsky D (1997) A point mutation in the Sendai virus accessory C proteins attenuates virulence for mice, but not virus growth in cell culture. *Virology* 238: 424-431.
- 50 Fujii Y, Sakaguchi T, Kiyotani K, Huang C, Fukuhara N, *et al.* (2002) Involvement of the leader sequence in Sendai virus pathogenesis revealed by recovery of a pathogenic field isolate from cDNA. *J Virol* 76: 8540-8547.
- Sakaguchi T, Kiyotani K, Watanabe H, Huang C, Fukuhara N, *et al.* (2003) Masking of the contribution of V protein to Sendai virus pathogenesis in an infection model with a highly virulent field isolate. *Virology* 313: 581-587.
- 55 Luque LE, Russell CJ (2007) Spring-loaded heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. *J Virol* 81: 3130-3141.
- 60 Tokusumi *et al.*, "Recombinant Sendai Viruses Expressing Different Levels of a Foreign Reporter Gene" *Virus Res.*, 86(1-2):33-38 (2002).
- 65 Nagai *et al.*, "Virus Sendai recombinante", *Patente de Estados Unidos N.º 7.442.544 (véase también la Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2005/0266566 y continuaciones relacionadas).*

- Kano *et al.*, "Vacunas para el virus del SIDA utilizando un vector de virus Sendai" *Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2010/0266633*.
- 5 Xiaoyan Zhan, "Development of Sendai Virus Vaccines to Prevent Pediatric Respiratory Infections" en http://www7.nationalacademies.org/gdest/_X_Zhan.GDES_China_Presentation.pdf 29 de marzo-1 de abril de 2006.
- 10 Takimoto *et al.*, "Recombinant Sendai Virus as a Novel Vaccine Candidate for Respiratory Syncytial Virus" *Viral Immunology*, 18(2):255-265 (2005).
- Jones *et al.*, "Human PIV-2 Recombinant Sendai Virus (rSeV) Elicits Durable Immunity and Combines with Two Additional rSeVs to Protect Against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV" *Vaccine*, 27:1848-1857, (2009).
- 15 Zhan *et al.*, "Sendai Virus Recombinant Vaccine Expressing hPIV-3 HN or F Elicits Protective Immunity and Combines with A Second Recombinant to Prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV Infections" *Vaccine*, 26:3480-3488 (2008).
- Hurwitz *et al.*, "Uso de un virus Sendai como una vacuna para la paragripe humana" *Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2006/0110740*.
- 20 Russell, Charles, "Proteínas de fusión de membrana de los virus de la gripe y de para gripe en infecciones y enfermedades" *Presentación de la Universidad Emory*, 1 de febrero de 2010
- Hurwitz, Julia L., "Development of Recombinant Sendai Virus Vaccines for Prevention of Human Parainfluenza and Respiratory Syncytial Virus Infections" *Pediatr Infect Dis J*, 27(5): Suplemento mayo de 2008
- 25 Hurwitz *et al.*, "Development of Sendai Virus-Based Vaccines to Prevent Pediatric Respiratory Virus Infections" *Procedia in Vaccinology*, 1:41-44 (2008).
- 30 Zhan *et al.*, "Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Expressed By Recombinant Sendai Virus Elicits B-cell and T-cell Responses In Cotton Rats and Confers Protection Against RSV Subtypes A and B" *Vaccine* 25:8782-8793 (2007).
- 35 Takimoto *et al.*, "Recombinant Sendai Virus Expressing the G Glycoprotein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Elicits Immune Protection Against RSV" *J Virol*. 78(11):6043-6047 (2004).
- Tokusumi *et al.*, "Vectores de paramixovirus usados para la transferencia de genes extraños", *publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2004/0137627 (véase también la Patente de Estados Unidos relacionada N.º 6.746.860)*.
- 40 Portner *et al.*, "Vector para terapia génica y vacunas, y métodos de uso del mismo", *publicación internacional n.º WO 01/92548*.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de virus Sendai recombinante que comprende un vector de virus Sendai modificado, comprendiendo el vector de Sendai modificado:
- 5 la secuencia polipeptídica de NP del virus Sendai SEQ ID NO: 5,
 la secuencia polipeptídica de P del virus Sendai SEQ ID NO: 7,
 la secuencia polipeptídica de M del virus Sendai SEQ ID NO: 11,
 la secuencia polipeptídica de F del virus Sendai SEQ ID NO: 13,
10 la secuencia polipeptídica de HN del virus Sendai SEQ ID NO: 15, y
 la secuencia polipeptídica de L del virus Sendai SEQ ID NO: 17.
2. El vector de virus Sendai recombinante de la reivindicación 1, en donde dicho vector es inmunogénico.
- 15 3. El vector de virus Sendai recombinante de las reivindicaciones 1 o 2, que tiene un gen o genes extraños insertados en una o más de una unión intergénica seleccionada del grupo que consiste en una N-P, una P-M, una M-F, una F-HN, una HN-L y combinaciones de las mismas.
4. El vector de virus Sendai recombinante de la reivindicación 4, en donde dicho gen extraño se selecciona del grupo
20 de una luciferasa, una proteína verde fluorescente y combinaciones de las mismas.
5. El vector de virus Sendai recombinante de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 o 5, en donde al menos un sitio de iniciación/detención génico está manipulado para modificar la transcripción génica.
- 25 6. El vector de virus Sendai recombinante de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde dicho gen extraño se selecciona del grupo que consiste en una proteína F del virus respiratorio sincicial (RSV); proteína G del virus respiratorio sincicial (RSV); proteína del virus paragripal tipo 1 (PIV-1); proteína del virus paragripal tipo 2 (PIV-2); proteína del virus paragripal tipo 3 (PIV-3); proteína del virus paragripal tipo 4 (PIV-4).
- 30 7. El vector de virus Sendai recombinante de la reivindicación 4, en donde dicho gen extraño es un gen indicador.
8. El vector de virus Sendai o el vector de virus Sendai recombinante de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, para su uso en un método de vacunación de un animal.
- 35 9. Una composición que comprende el vector de virus Sendai de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables, o cualquier vehículo, adyuvante o diluyente.
10. El vector de virus Sendai recombinante de las reivindicaciones 1-7, el vector de virus Sendai o el vector de virus Sendai recombinante para el uso de la reivindicación 8, o la composición de la reivindicación 9, en donde dicho gen
40 extraño está insertado entre un gen P del virus Sendai y un gen M del virus Sendai;
 en donde dicho gen extraño está insertado entre un gen M del virus Sendai y un gen F del virus Sendai; o
 en donde dicho gen extraño está insertado entre un gen F del virus Sendai y un gen HN del virus Sendai.
- 45 11. El vector de virus Sendai recombinante de las reivindicaciones 1 - 8, en donde dicho vector está mezclado con al menos otro antígeno o inmunógeno.

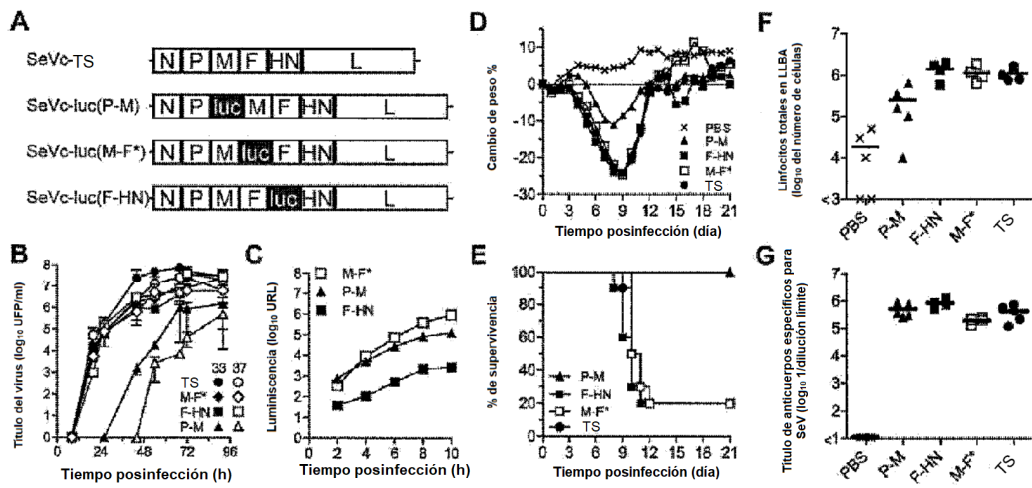


FIG. 1

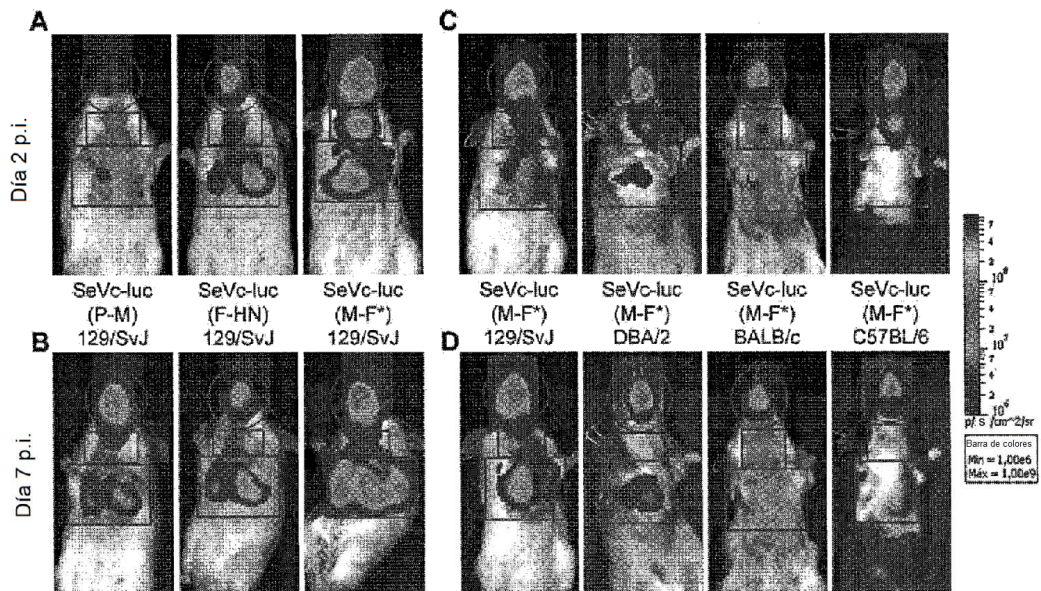


FIG. 2

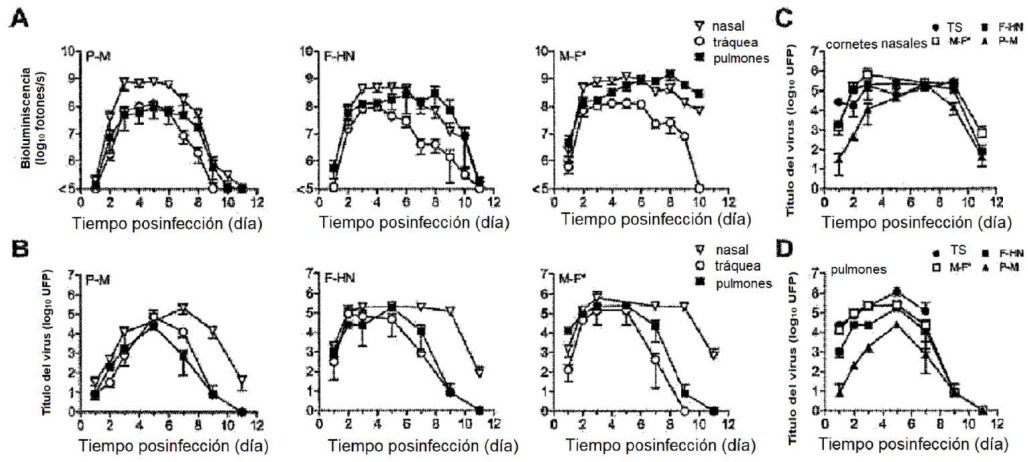


FIG. 3

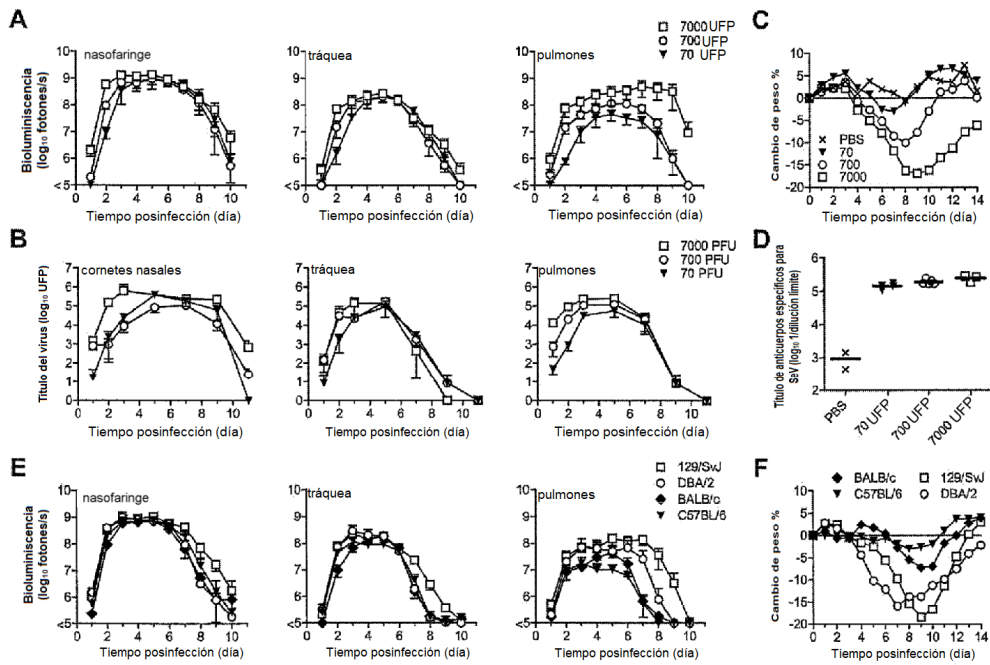


FIG. 4

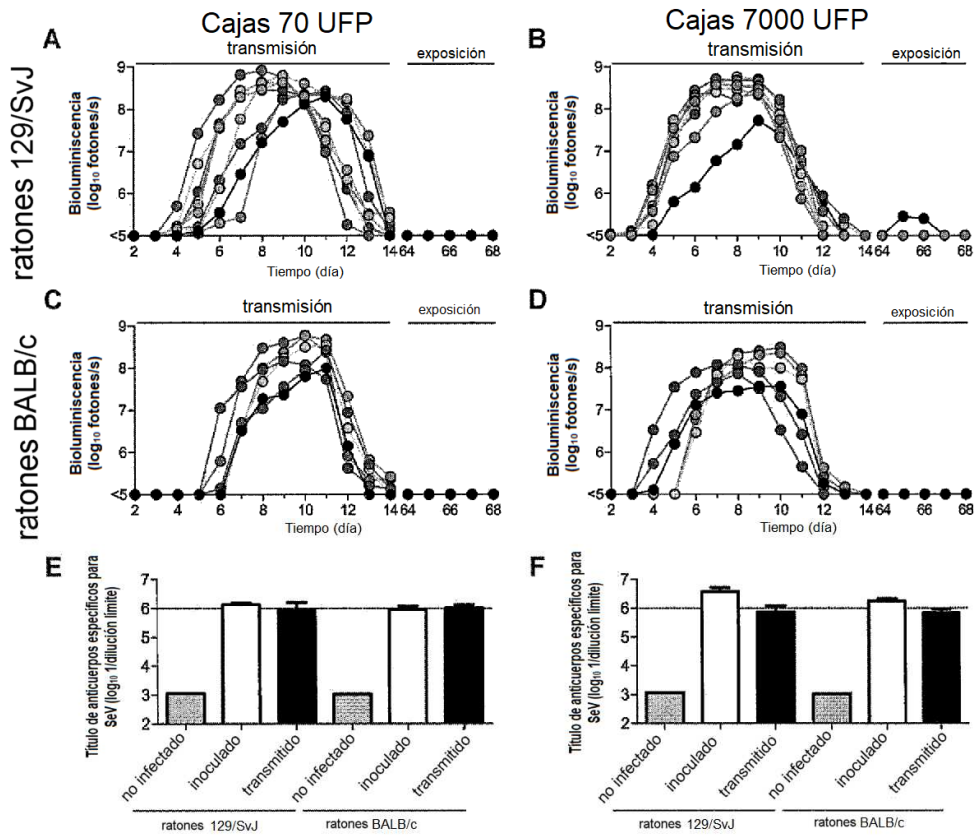


FIG. 5

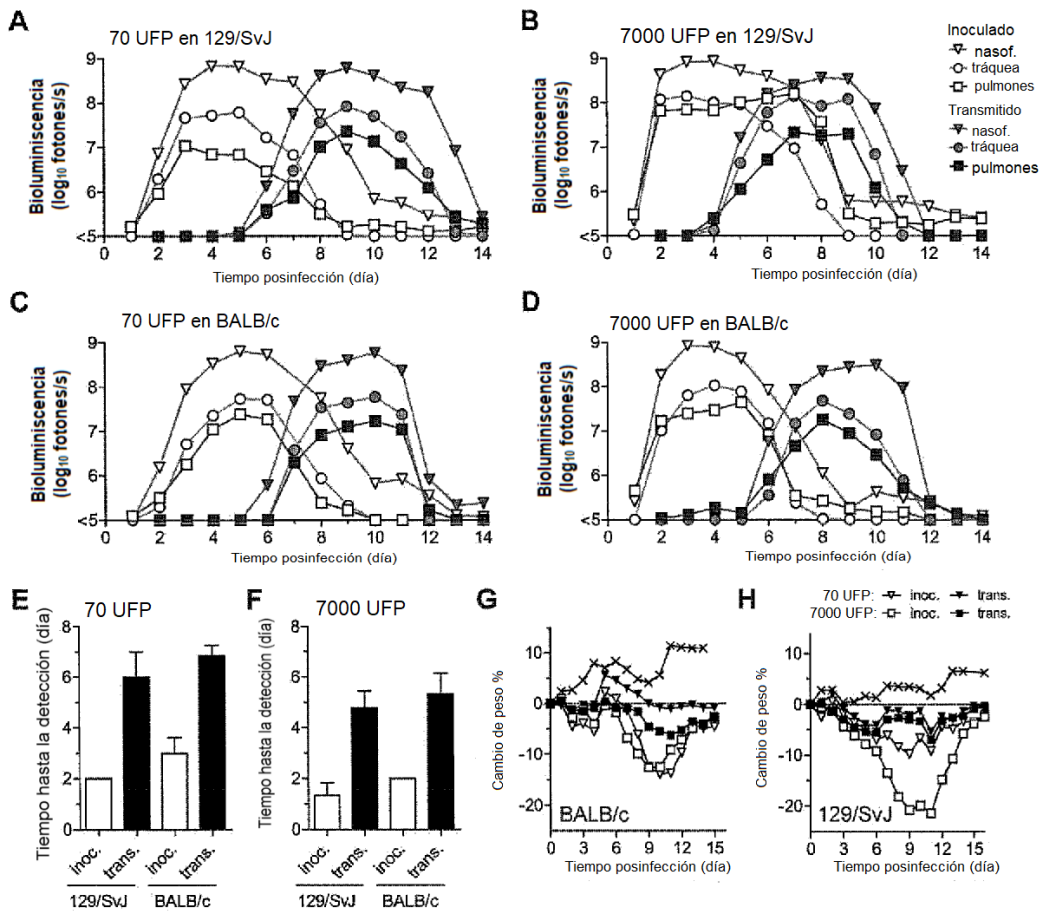


FIG. 6

Secuencia del plásmido pSVc (SEQ ID NO: 3)

cgttaatacgcactcactataaccaacaagagaaaaaacatgtatgggatataatgaagttagacagg
 attttagggtcaaagtatccaccctgaggagcaggttcagacccttgcttgctgccaagttcacg
 gccgggttggtgagcaccttcgatacatttagctctaggaggagcgaagtattaataagtcgggagg
 aggtgctgttatccccggccagaggagcacagctctcagtgctctgactaggcccaagtgtgactgatgat
 gcagacaagttatcattgcaactaccttcctagctcactcattggacacagataagcagcactctcaga
 gaggagggttcctcgtctctctgcttggcatggcttacagtagtccagaattgtacttgacaacaaacgg
 agtaaacgccgatgtcaaatatgtgatctacaacatagagaaagaccctaagaggacgaagacagacggga
 ttcatgtgaagacgagagatatggaatatgagaggaccacagaatggctgttggacctatggatcaaca
 agagccactcttccagggtcaacgggatgctgcagaccctgacacactccttcaaacctatgggtatcc
 tgcatgcctaggagcaataatgtccaagtctggattgtgctgggaaggccatcacaaagcagcggggc
 ttaaggaaagggttcttcaacaggttagaggcgttcagacaagacggcaccgtgaaagggtcccttagttt
 tcaactggggagacagttgaggggataggctcggttatgagatctcagcaaaccttgatctctcatggt
 tgagacccttgtagactatgaactgcaagatctgatctcaccacattagagaagaacatccagatcgtt
 gggaactacatccgagatgcagggtcggcttcttcatgaacactatataaatatgggggtggagacaaaga
 tggcagctcctaacgttgtcaaacctgaggcccgatattaataagattagaagcctcatagacacctacct
 gtcaaaaggccccagagctccctttatctgtatcctcaaggaccctgttcatgggtgaatttgctccaggc
 aattatcctgcactatggagtacgccatgggagtcgccgtcgtacagaacaaggcaatgcagcagtagc
 tcacaggggaggacataccttgatatggaaatgttcttactaggacaagcggaggcaaggatgctgaatc
 gaagatcagcagtgccctggaagatgagttaggagtgcggatacagccaaggagaggctcagacatcat
 ctggcaacttgctccgggtggggatgggtgcttaccacaaaccaacaggcgggtgggtgcaattgaggtagctc
 tagacaatgccgatatcgacctagaacagaagctcatgcggaccaggacgctagggggtgggggtggaga
 aagtgggtgaaagatgggcagctcaggtgagtggtggccactttgtcacactacatggggctgaacggta
 gaggaggaaaccaatgatgaggatgtatcagacatagagagaagaatagccatgagactcgagagagac
 ggcaaggagattctgcaaccatggagatgaaggccgaataacgggtgtcgatcacgacgaagatgacga
 taccgacgagtagctgggataggaggaatc gatcatacaggcctcaaggtacttgatccgtagta
 agaaaaacttaggggtgaaagttcatccactgatcggctcaggcaaggccacaccaaccaccgaccac
 acccagcagtcgagacagccacggcttcggctacacttaccgc gatcaag CCTTCATTCTTAAA
 GAAGATTCTGAAGTTGAGAGGGAGGCCAGGAGGAAGAGAGTCGCTCTCGGATGTTATCGGATTCCTCG
 ATGCTGTCCTGTGAGTGAACCAACTGACATCGGAGGGGACAGAAGCTGGCTCCACAACACCATCAACAC
 TCCCAAGGACCAGGCTCTGCCATAGAGCCAAAAGT GAGGGCGAAGGAGAAGTCTCAACACCGTCGACC
 CAAGATAATCGATCAGGTGAGGAGAGTAGAGTCTCTGGGAGAACAAGCAAGCCAGAGGCAGAAGCACATG
 CTGGAAACCTTGATAAACAAAATATACACCGGGCCTTTGGGGGAAGAAC TGGTACAAACTCTGTATCTCA
 GGATCTGGGCATGGAGGAGACTCCGGAATCCTTGAAAATCCTCAAATGAGAGAGGATATCCGAGATCA
 GGTATTGAAGATGAAAACAGAGAGATGGCTGCGCACCCTGATAAGAGGGGAGAAGACCAAGCTGAAGGAC
 TTCCAGAAGAGGTACGAGGAGGTACATCCCTACCTGATGAAGGAGAAGGTGGAGCAAGTAATAATGGAAG
 AAGCATGGAGCCTGGCAGCTCACATAGTGAAGAG ctggggtcctggtgatccttagccccgaactC
 gaagaggctgtgctacggaggaaacaaaagaagacctaacaacagtggggtccaacctcttactccagcaa
 ccgtgcctggcaccgggtcccaccgctgaatcgttacaacagcacagggtcaccaccagggaaaaccccc
 atctacacaggatgagcacatcaactctggggacacccccgcccgtcagggtcaaagaccggaaaccacca
 atagggaccgctctgtctcagattgtccagccaacggccgcccaatccaccgggtctagagaccgact
 caacaaaaaagggtcataggagagaacacatcatctatgaaagagatggctacattggtgacgagctctgg
 tghtaatccagtctgctcaagaattcgagtcatcccagagcgcgagttatgtgttgcaagacgtgcccta
 aagtctgcaaacatgcagagatgacattcaatgtatgcccctgatccttctgcccagaaaatttccg
 ctctgtaaggtagatgagaacaaacaactgctcaaacagatc caagagagcgtggaatcattccgggatat
 ttacaagagattctctgagtatcagaagaacagaactcattgctgatgtccaacctatctacacttcat
 atcatcacagatagagggtggcaagactgacaacacagactccttacaagggtccccctccgtttttgcaa
 aatcaaaagagaacaagactaaggctaccaggttgaccatctatggagaccctagaagatatgaagta
 caaacggacctaatccgagaggatgaatttagagatgagatccgcaaccgggtgtaccaagagaggggac
 acagaaccagggcctcaaacgcatcacgctcctcccctcaaagagaagcccacaatgcactctctca
 ggctcgtcatagagagcagtcacctaaagcagagctgagaaagcagcatatgtgaaatcattatccaagtg
 caagacagaccaagagggttaaggcagtcaggaactcgtagaagaggacatagagtcactgaccaac

FIG. 7A

atccgggtgaggcatcctaccatcctcagtcatagagagatccaattaattaacagcatcagccagtaa
agattaagaaaaacttagggtgaaagaaatccacctaacacggcgca█gcagatatctatagattcc
ctaagttctcatatgaggataacgggtactgtggagcccctgcctctgagaactgggtccagataagaaagc
catcccctacatcaggattatcaaggtagggagaccctcctaaacatggagtgagatacctagatttattg
ctcttgggtttctttgagacaccgaaacaaacaaccaatctaggggagcgtatctgacttgacagagccga
ccagctactcaataatgaggctccgggtcgttacccataggggtggccaaataactacgggactgatcagga
actcttaaaaggcctgcaccgatctcagaattacgggtgaggaggactgttcgagcaggagagatgatcgt
tacatgggtggattcgattgggtgctccactcctaccatggtcaggcaggctgagacaggggaatgatatt
atgcaaaacaggctgcactagctcccattgcctccctgtggacaaggacataagattcagagtggtgtt
tgtcaatgggacatctctaggggcaatcaccatagccaagatcccaaagacccttgcagacccttgcatg
cccaactctatatccgttaacctactggtgacactcaagaccgggatctccacagaacaaaaggggggtac
tcccagttacttgatgatcaaggggagaaaaagctcaattttatgggtgcacctcgggttgatcaggagaaa
ggctcgggaagatatactctgttgagtactgcaagagcaagattgagagaatgaggctgattttctcactt
gggttaatcggcgggtataagcttccatgttcagggttactgggacactatcgaagacattcatgagtgcagc
tcgcatgggaagaggggcagctctgctcccattaatggatgtgaaatcccataatgaacctgggtgatttgggc
ggcatctgtagaaatcacaggcgtcgatgagggtgttccaaccggccatecctcgtgatttccgctactac
cctaattgtgtggcctaagaacatcgggaaggatcagaagctg█atgtgcaccatcagagacctgcga
caatgcccaagcagacaccacctggcagtcggagccaccgggtcactccttgtcttaataagaaaaac
ttagggataaagtcccttgtgagtgttgggttgcaaaactcctcgtacgggaaac█acagcatatc
cagaggtcacagtgcatctcaacatcactactggttgttctcaccacattgggtctcgtgtcagattcca
gggataggctctctaacataggggtcatagtcgatgaagggaaatcactgaagatagctggatcccacga
atcgaggtacatagtagtactgagtctagttccgggggtagaccttgagaatgggtgcggaaacagcccagggt
atccagtacaagagcctactgaacaggctgttaatccattgaggggatgccttagatcttcaggaggctc
tgataactgtaccaatgatacagacacaaaatgccgggtgtccacagtcgagattcttcgggtgctgtgat
tggtactatcgcaactggagtgccgacatcagcacagatcaccgcagggttgactagccgaagcggagg
gaggccaaaagagacatagcgtcatcaagaatcgatgacaaaaacacacaagtctatagaactgctgc
aaaacgctgtggggggaacaaattcttgcctaaagacactccaggatttctgtaatgatgagatcaaacc
cgcaataagcgaattaggctgtgagactgctgccttaagactgggtataaaattgacacagcattactcc
gggctgttaactgcgcttcggctcgaatttcggaaccatcggagagaagagcctcacgctgcaggcgtgt
cttcactttactctgctaaccattactgagattatgaccacaatcaggacagggcagctaacatctatga
tgtcatttatacagaacagatcaaaggaacgggtgatagatgtggatctagagagatacatggttaccctg
tctgtgaagatccctattctttctgaagtcccagggtgtgctatacacaaggcatcgtctatttcttaca
acatagacggggaggaatggatgtgactgtcccagccatatactcagtcgtgcttcttcttaggggg
tgcagacataaccgattgtgttgagtcagggttgacctatataatgcccagggtatccgcacaactgata
cctgacagccagcaaaagtgtatcctgggggacacaacaagggtgtcctgtcacaagaattgtggacagcc
ttatcccgaagtttgcctttgtgaatgggggctgtgtgtaactgcatagcatccacatgtacctgcgg
gacaggccgaagaccaatcagtcaggatcgctcctaaagggtgtagtattcctaaccatgacaactgtggt
cttatagggtcaatggggtagaattgtatgctaaccggagaggggcacgatccacttgggggggtccaga
acttgacagtcggctcctgcaattgctatcagaccgttgatatttctctcaaccttgcgtgatctacgaa
tttcttgcaagactctaaggctgagcttgagaaagcacggaaaatcctctctgaggtaggtagatggtag
aactcaagagagactgtgattacgatcatagtagttatggctgtaaatattgggtggtcattatagtgatc
tcatcgtgctttatagactcagaaggatcaatgctaattgggtaatcagatgaccgtataccgaggggacac
atatacattagagccgaagatcagacatagtacacaaacgggtgggtttgatgcatggctgagaaaaga
█tcagagtttaaacagatgtcttgtaaagcaggcagtggtatccgttgagatctgtatataataagaa
aaacttgggtgaaagtgaggtcgcgcggtacttttagct█ggccggacattataagaaaaacttagggt
gaaagtgagggccgcaaaacaaagcacagat█gatgggtgtagggggcaaacgtgactcgtactggctc
acctctcctagtggttagcactacaaaattagcatcagggttgggagagggtcaagtaaagtgcacacatggt
tgctgattctctcattcaccagtgggctttgtcaattgccacagtgatcatctgtatcataatttctgc
tagacaagggtatagatgaaagagtagtcaatgactgtagaggcattgaacatgagcagcaggggaggtg
aaagagtcacttaccagtcataaaggcaagagggtatcgcaagggtgtcaacattcagagctctgtgc
aaaccggaatcccagcttggttgaacaaaaacagcagggtatgcatccagatgattgataagctcgtgcag
cagacaagagctcactcagctctgtgagagtacgatcgagtcaccatgccgagggaattgccctctt

FIG. 7A continuación

gagccacatagtttctggagatgcctgtcggagaaccgtatccttagctcagatcctaaaatctcattgc
 tgcctggccgagccttggtatctgggtctacaacgatctctggatgtgttaggctcccttcaactcctcaat
 tggcgaggcaatctatgcctattcatcaaatctcattacacaagggttgctgacatagggaaatcatat
 caggctctgcagctagggtacatatcactcaattcagatatgttccctgatcttaaccccgtagtgtccc
 aacttatgacatcaacgacaatcggaaatcatgctctgtggggcaaccgggactaggggttatcagct
 ttgctccatgccgactgtagacgaaagaaccgactactctagtgatggatcgaggatctggctccttgat
 gtcctggatctcaaaggagcactaagtctcacgggatcgcaacagcgaggtagatcttgatcaccctgt
 tctctgactatacccagtgtagcaacggcattgcaacagaaggctcattgatatttcttgggtatgg
 tgggctaaccacccctctacagggtgatacaaaatgtaggaccaaggatgccaacagggtgtcgcaagac
 acatgcaatgaggctctgaaaattacatggctaggaggggaaacagggtggcagcgtgatcatccaggctca
 atgactatctctcagagaggccaagataagagtcacaaccattccaatcactcaaaactatctcggggc
 ggaaggtagattatataaaatgggtgatcgggtgtacatctatacaagatcatcaggctggcactctcaa
 ctgcagataggagtacttgatgtcagccaccctttgactatcaactggacacctcatgaagccttgtcta
 gaccaggaaatgaagagtgaattggtacaatacgtgtcgaaggaatgcatatcaggcgtatacactga
 tgcttatccatigtcccctgatgcagctaacgtcgctaccgtcacgctatatgccaatacatcgctgtc
 aaccaacaatcatgtattctaactactaactataaaatggttaaggataaaggatgttcaattag
 aggctgcatataccacgacatcgtgtatcacgcattttggtaaggctactgctttcacatcatcgagat
 caatcagaagagcctgaataccttacagccgatgctctttaagactagcatccctaaattatgcaaggcc
 gagctctatataactgactagcaggctggcgcgcttctgacacttagagtcactcgaacatccac
 aatatctctcagctctctacgtctctcagatttaagaaaaccagggtgaatgggaagccttgccata
 ggtcctgagatgggaggagctctccaaaacccttctgacatactctatccagaatgccacctgaactct
 cccatagtcagggggaagatagcacagttgcacgtcttggtagatgtgaaccagccctacagactgaagg
 acgacagcataataaatattacaagcacaatttaggaacggaggattgtccccctcaaattaagat
 caggctcttgggtaaggctcttcaacgcacaataaaggatttagaccgatacacgttgaaccgtacca
 acctactctcaggaattacttaggcttgatataccagagatatgtgacaaaatccgatccgtcttcgagg
 tctcggatcggctgaccaggagttatctagtgggttcaggatcttgggtgaatatcttcaagcaact
 aggcaatatagaaggaagagaggggtacgatccgttgcaggatatcggcaccatcccggagataactgat
 aagtacagcaggaatagatggtataggccattcctaactgggtcagcatcaaatatgacatcggtgga
 tgcagaagaccagaccggggggacccttgatacctctaattcacataacctctagaatgcaaatcata
 cactctagtaacatacggagatcttgtcatgatactgaacaagttgacattgacagggtatatacctaacc
 cctgagctggctcttgatgtattgtgatgtttagaaggaagggtggaatatgtctgctgaggcatctag
 ataagaagtccattgggataacaagcaagggtgaggaattatgggaactagtgattccctcttctcaag
 tcttggagaggaaatatacaatgtcatcgactattggagccctatcacttgcctctcatacaactaaat
 gatcctgttatacctctacgtggggcatttatgaggcatgtttgacagagctacagactgttttaaaa
 gtagagacgtgtacacagatgctgaagcagacactattgtggagtcttactcgccattttccatggaac
 ctctattgatgagaaagcagagatctttccttctttaggacatttggccaccccagcttagaggctgtc
 actgccgccgacaaggtaagggccatatagtatgcacaaaaggcaataaagcttaagacctatacagat
 gtcattgagtttttgcactatcatcataaatgggtatagagagaggcatggcggacagtgggccccctg
 tgacttccctgatcacgtgtgtctagaactaaggaacgctcaagggtccaatacggcaatctcttatgaa
 tgtgctgtagacaactatacaagtttcataggcttcaagtttccggaagtttatagaaccacaactagatg
 aagatctcacaatatataatgaaagacaaagcactatccccagggaaggaggcatgggactctgtataccc
 ggatagtaatctgtactataaaagcccagagctctgaagagaccggcggcttattgaagtgttcataaat
 gatgagaatttcaaccagaagaaattatcaattatgtggagttaggagattggttgaaagacgaggagt
 tcaacatctcgtacagctctcaagagaaagagatcaagcaagagggtcgtctattcgcaaaaatgactta
 taagatgcgagccgtacagggtgctggcagagacactactggctaaaggaataggagagctattcagggaa
 aatgggatgggttaaggagagatagacctacttaaaagattgactactcttctgtctcaggcgtcccc
 ggactgattcagtgtaacaactctaaatcatcagagaagagaaacgaaggcatggaaaataagaactc
 tgggggggtactgggacgaaaagaagggtccagacatgaattcaaggcaacagattcatcaacagacggc
 tatgaaacgttaagtgttctcacaacagacctcaagaaatactgcttaactggagatttgagagta
 ctgattgtttggctcagagatgcaacgagatattggcttcaagacctctttaaactggatgcatccagt
 ccttgaaagggtgacaatatatgttggagatccttactgtccagtcgccgaccggatgcatcgacaactc
 caggatcatgcagactctggcattttcatacataatccttagggggggcatagaagggttactgccagaagc

FIG. 7A continuación

tgtggaccttaatctcaatcagtgcaatccacctagcagctgtgagagtgggtgtcagggtctctgcaat
 gggtcagggtgacaatcaagctatagccgtgacatcaaggtacctgtagctcagacttacaagcagaag
 aaaaatcatgtctatgaggagatcaccaaatatttcgggtgctctaagacacgtcatgtttgatgtagggc
 acgagctaaaattgaacgagaccatcattagtagcaagatgittgtctatagtaaaaggataactatga
 tgggaagattttaccacagtgccctgaaagccttgaccaagtgtgtattctgggtccgagacactggtagat
 gaaaacagatctgcttgttcgaacatctcaacatccatagcaaaagctatcgaaaatgggtattctccta
 tactaggctactgcattgcgttgatataagacctgtcagcaggtgtgcatatcactagggtgactataaa
 tccaactatcagcccgaccgtaagagatcaatactttaagggtaagaattggctgagatgtgcagtggtg
 attccagcaaatgttggaggattcaactacatgtctacatctagatgctttgttagaaatattggagacc
 ccgagtagcagccctagctgatctcaaaagattcatcagagcggatctgttagacaagcaggtattata
 cagggtcatgaatcaagaaccgggtgactctagtttctagattgggcttcagacccttattctgtgaac
 ctcccgcattctcagagtataactacgattataaagaatatcactgctagatctgtgctgcaggaatccc
 cgaatctctactgtctggtctcttcaccgagactagtggaagaggatctcaacctggcctcgttcct
 tatggaccggaaagtcatcctgccgagagtggctcatgagatcctgggtaattccttaactggagttagg
 gaggcattgcagggatgcttgatacgaacagctctctagtgagagccagcgttaggaaaggaggattat
 ccatgggatattgaggaggcttgtcaattatgatctattgagtagcagacactgactagaactctcag
 gaaaccggtgaaagacaacatcgaatagatataatgtgttcagttgagctagctgtcggctcaaggcag
 aaaatgtggatccacctgacttacgggagaccatacatgggttagaaacaccagacccttagagctct
 tgaggggaatatttatcgaagggtcagaggtgtgcaagccttgagggtcgaaggagcagaccatcta
 tacatggttctatcttctgacaatatagacctggacacgcttacaacgggatgtcggctataagaatc
 ccctattttggatcagccactgatgaaagggtcgggaagccaactcgggtatgtaagaaatctaagcaaac
 ccgcaaaggcggccatccggatagctatggtgtatagctgggcttacgggactgatgagatatcgtggat
 ggaagccgctcttatagccaaacaagagctaatctgagcttagagaatctaaagctgctgactcctggt
 tcaacctccactaatctatctcataggttgaagatacggcaaccagatgaagttctctagtgaacac
 tagtccgtgcaagtcgggttcataacaatatcaaatgataacatggcactcaagaagcaggggagtcgaa
 ggataactaatctcgtgtatcagcagattatgctaactgggctaagcttgttcgagttcaatatgagatat
 aagaaagggtccttagggaagccactgatattgcacttacatcttaataacgggtgctgtataatggagt
 cccacaggaggcgaatatcccccaagggtccacattagatttagagattacacaagagaacaataaatt
 gatctatgatcctgatccactcaaggatgtggaccttgagctatttagcaagggtcagagatgtgtacat
 acagttgacatgacttattgggtcagatgatgaagttatcagagcaaccagcatctgtactgcaatgacga
 tagctgatacaatgtctcaattagatagagacaacttaaaagagatgatcgactagtaaatgacgatga
 tgtcaacagcttgattactgagtttatgggtgatgatgttctttattttgctcaacgttcgggggtatt
 ctagtcaatcagtttgcatactcactctacggcttaaacatcagaggaagggaagaaataggggacatg
 tagtccggttcttaagataacctcccacgcagttctaaaagcttatctaattgctctatcccacccaa
 aatcttcaaacgattctggaatgcaggtgtcgtggaacctgtgtatgggcctaacctctcaaatcaggat
 aagatactcttggccctctctgtctgtgaatattctgtggatctattcatgcacgactggcaaggggtg
 taccgcttgagatctttatctgtgacaatgaccagatgtggccgacatgaggaggtcctcttcttggc
 aagacatcttgatacctatgcagcttggcagagatatctagggatgggccaagattagaatcaatgaac
 tctctagagaggctcgagtcactaaagagttacctggaactcacatttcttgatgaccgggtactgaggt
 acagtcagttgactggcctagtcatcaaagtattcccactactttgacctatatccggaagtcactat
 aaaagtgttaaggacaagaggtataggagtcctgaaagtcttagaagattgggatcccgaggcagataat
 gcactgttagatggatcgccgcagaaatacaacagaatatcttgggacatcagactagagcccctt
 tttgggggttgagagtatccaagtcacaggtactgcgtctccgggggtacaaggagatcacaagaggtga
 gataggcatcaggtgttggctgacggttaccattcgatggaagatatctatctcaccagctgaggctc
 tttggcatcaacagtagctgcttgaagcacttgaacttacctattgagccccttagttgaca
 aggataaagataggctatatttaggggaaggagctggggccatgcttctctgttatgacgctactctgg
 cccatgcatcaactattataactcaggggtatactctgtgtatgcaatgggcagagagagttaaatata
 tatcctgctgaggtggcacttagtgggaaagaaatcaaacatgttactagtctgggtcaaagagttaaag
 tgttattcaacgggaatcctggctcgacatggattgggaatgatgagtgtaggctttgatttggaatga
 attacagaatagctcgataggcctagtccactgtgacatggaggaggagatcataaggatgatcaagtt
 gtactgcatgagcattacagtgtaatccggatcgctatctgggtgggggatcgagacgttgtgcttataa
 gcaagattgctcccaggctgggcacggattggaccaggcagctcagcctatatctgagatactgggacga

FIG. 7Acontinuación

ggtaaacctaatagtgcttaaaacatctaaccctgcttcacagagatgtatctcctatcgaggcacccc
 aatctgacattatagaggacagcaagacagtgtagctagctcctcctttgtcaaaagaagatagca
 tcaagatagaaaagtggtatcctaagagaaggcaaggctcacgaatgggttactcggaattgagaga
 aggaagctcttcatcagggatgcttagacctaccatcaagcactgcagacggttgctttgaaccaaac
 ttgtataaattgagcagagatttctgtccaccatgaacatagctgatacacacaactgcatgtagctt
 tcaacagggttttgaaggatacaatcttgaatgggctagaataactgagtcagataaaaggcttaaact
 aactggtaagtatgacctgtatctgtgagagattcaggcaagttgaagacaatttctagaagacttgtg
 ctatcttggatattttatctatgtccacaagattggtaactgggtcattccctgaccagaagtttgaag
 caagacttcaattgggaatagtttcatfcatcccgtgaaatcaggaacctgagggttatcacaanaac
 tttattatacaggtttgaggatattatacatagataaacgtatagattcctcacaanaagaaatgaagatt
 ttgtgaagatttttagggcagtcagatgttcggggccaggcaaatgaatacagacctgattgatg
 atggatcactaggtgatcagagccatagacagctcgttaattagtcctatcgtgcagaacgatcga
 aagctccgcggtacctggaagtcttggacttgtccatagcaaatagtaagaaaaacttacaagaagaca
 agaaaatttaaaggatacatatctttaaactcttgtctgggtgggtcggcatggcatctccacctctc
 gcggtccgacctgggcatccgaaggaggacgtcgtccactcggatggctaagggaggggcccccggggg
 ctgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccct
 tggggcctctaaacgggtcttgggggtttttgtgaaaggaggaactatatcggatcgagacctcga
 tgccggctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttccaccgcatatggtgcactctca
 gtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgacctg
 acgggcttctgctcctcggcatccgcttacagacaagctgtgacctctcgggagctgcatgtgtcag
 aggttttaccgctacaccgaaacgcgcgagacgaaaggccctcgtgatacgcctattttataggta
 atgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtgcggaaccctat
 ttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaa
 taatattgaaaaaggaagagatgagattcaacatttccgtgtcgccttattccttttttgggcat
 tttgcttccctgtttttgtcaccagaaacgctgggtaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc
 acgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggccgaagaactg
 tttcaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcccggcaag
 agcaactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttgggtgagtaactaccagtcacagaaaagca
 tcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaactcggcc
 aacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcaacaatgggggatcatg
 taactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccagat
 gcctgtagcaatggcaacaacggttcgcaaaactattaactggcgaactacttacttagcttcccggcaa
 caattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccttccggctggct
 ggtttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgacgactggggccaga
 tggttaagcctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaataga
 cagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatac
 tttagattgatttaaaacttatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcat
 gacaaaatcccctaactgagtttctgttccactgagcgtcagaccgtagaaaagatcaaaggatct
 tcttgagatcctttttctgctgctaatctgctgcttgcaaaacaaaaaacaccgctaccagcgggtg
 tttgtttcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacc
 aaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatac
 ctgctctgctaactctgttaccagtggtgctgctgccagtggtgataagtcgtgtcttaccgggttgact
 caagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggttctgtgcacacagcccagctt
 ggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttcccga
 gggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacagggagcttccag
 ggggaaacgctggtatctttatagctctgtcgggtttcggcacctctgacttgagcgtcgatttttgtg
 atgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgagcaacgcgccctttttacggttcttggccttt
 tgcctggccttttctcacatgttcttctcctgcttattcccctgattctgtggataaccgtattaccgct
 ttgagtgagctgataaccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagctcagtgagcaggaagcggga
 agagcggccaatacgaacgcctctcccgcgcttggccgattcattaatgacgctggcagcagcag
 tttcccgactggaaagcggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcacccc
 agcctttacactttatgctccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacagg

FIG. 7Acontinuación

aaacagctatgacatgattacgccaagcttgcacgctgcaggtcgacg

FIG. 7A continuación

ADNc de NP (SEQ ID NO: 4)

gcccgggttggtgagcaccttcgatacatttagctctaggaggagcgaagtattaataagtccgggag
gagtgctgtttatccccggccagaggagcacagctctcagtggtcgtactaggccaagtgtgactgatga
tgcagacaagttattcattgcaactaccttcctagctcactcattggacacagataagcagcactctcag
agaggagggttcctcgtctctctgcttgccatggccttacagtagtccagaattgacttgacaacaaacg
gagtaaacgccgatgtcaaatatgtgatctacaacatagagaagaccctaagaggacgaagacagacgg
attcattgtgaagacgagagatatggaatatgagaggaccacagaatggctgtttggacctatgggtcaac
aagaccactcttcagggtaaacgggatgctgcagaccctgacacactccttcaaacctatgggtatc
ctgcatgcctaggagcaataattgtccaagctggattgtgctggtgaaggccatcacaagcagcgcgg
cttaaggaaagggttcttcaacaggtttagaggcgttcagacaagacggcaccgtgaaagggtgccttagt
ttcactggggagacagttgaggggataggctcggttatgagatctcagcaaagccttgatctctcatgg
ttgagacccttgtagactatgaatactgcaagatctgatctcaccacattagagaagaacatccagatcgt
tgggaactacatccgagatgcagggctggcttccttcatgaacactattaatatggggtggagacaaag
atggcagctcctaactgtcaaacctgaggccgatattaataagattagaagcctcatagacacctacc
tgtcaaaaggccccagagctccctttatctgtatcctcaaggaccctgttcatggtgaatttgctccagg
caattatcctgcactatggagttacgccatgggagtcgccgtcgtacagaacaaggcaatgcagcagtac
gtcacagggaggacataccttgatatggaaatgttcttactaggacaagccgtggcaaggatgctgaat
cgaagatcagcagtgccctggaagatgagttaggagtgacggatacagccaaggagaggctcagacatca
tctggcaaacctgtccgggtggggatgggtgcttaccacaaaccaacaggcgggtggtgcaattgaggtagct
ctagacaatgccgatatcgacctagaaacagaagctcatgaggaccaggacgctaggggttgggggtggag
aaagtggtgaaagatgggcacgtcaggtgagtggtggccactttgtcacactacatggggctgaacgggt
agaggaggaaaccaatgatgaggatgtatcagacatagagagaagaatagccatgagactcgagagaga
cggcaagaggattctgcaaccatggagatgaaggccgcaataacgggtgctgatcacgacgaagatgacg
ataccgcagcagtagctgggataggaggaatc

FIG. 7B

ADNc de P: (SEQ ID NO: 6)

atggatcaagatgccttcattccttaaagaagattctgaagttgagagggaggcgccaggaggaagagagt
 cgctctcggatggtatcggattcctcgcgatgctgtcctgtcgcagtgaaactgacatcggaggggacag
 aagctggctccacaacaccatcaacactcccccaaggaccaggctctgcccatagagccaaaagtggggc
 gaaggagaagctcacaacaccgtcgcaccacaagataatcgatcagggtgaggagagtagagctctgggagaa
 caagcaagccagaggcagaagcacatgctggaaaccttgataaaacaaaatatacaccgggaccttggggg
 aagaactggtacaaactctgtatctcaggatctggcgatggaggagactccggaatccttgaaaatcct
 ccaatgagagaggatattccgagatcaggatttgaagatgaaaacagagagatggctgcgaccctgata
 agaggggagaagaccaagctgaaggactccagaagaggtagcaggagggtacatccctacctgatgaagg
 agaaggtggagcaagtaataatggaagaagcatggagcctggcagctcacatagtgcaagagtaactggg
 gtcctgggtgattcctagccccgaactcgaagaggctgtgctacggaggaacaaaagaagacctaccaaca
 gtgggtccaaacctctactccagcaaccgtgcctggcaccgggtccccaccgctgaatcgttacaacag
 cacagggtcaccaccaggaaaacccccatctacacaggatgagcacatcaactctggggacacccccgccc
 gtcagggtcaaagaccggaaaccaccaatagggaccggctctgtctcagattgtccagccaacggccgccc
 caatccaccgggtctagagaccgactcaacaaaaagggcataggagagaacacatcatctatgaaaga
 gatggctacattggtgacgagcttgggtgtaatccagctctgctcaagaattcagatcatcccagagacg
 agttatgtgttgaagacgtgccctaaagtctgcaaaactatgcagagatgacattcaatgtatcggcc
 tgatcctttctgcccagaaatcttccgctcgttaaggtagatgagaacaaacaactgctcaaacagatcca
 agagagcgtggaatcattccgggatatttacaagagatttctctgagtatcagaagaacagaactcattg
 ctgatgtccaacctatctacacttcatatcatcacagatagagggtggcaagactgacaacacagactccc
 ttacaaggtccccctcgtttttgcaaaatcaaaagagaacaagactaaggctaccagggttgaccatc
 tatggagaccctagaagatatgaagtacaacaccggacctaatccgagaggatgaatttagagatgagatc
 cgcaaccgggtgtaccaagagaggacacagaaccagggtcctcaaacgcatcacgctcctccccctcca
 aagagaagcccacaatgcactctctcaggctcgtcatagagagcagctccctaagcagagctgagaagc
 agcatatgtgaaatcattatccaagtgcaagacagaccaagagggttaaggcagctcatggaactcgtagaa
 gaggacatagagtcactgaccaactag

FIG. 7C

ADNc de C (SEQ ID NO: 8)

ATGCCTTCATTCTTAAAGAAGATTCTGAAGTTGAGAGGGAGGCGCCAGGAGGAAGAGAGTCGCTCTCGGATGTTATCGGAT
 TCCTCGATGCTGTCTGTGCGAGTGAACCAACTGACATCGGAGGGGACAGAAGCTGGCTCCACAACACCATCAACACTCCCC
 AAGGACCAGGCTCTGCCATAGAGCCAAAAGTGAGGGCGAAGGAGAAGTCTCAACACCGTCGACCCAAAGATAATCGATCAG
 GTGAGGAGAGTAGAGTCTCTGGGAGAACAAAGCAAGCCAGAGGCAGAAGCACATGCTGGAAACCTTGATAAAACAAAATATAC
 ACCGGGCTTTGGGGGAAGAACTGGTACAACTCTGTATCTCAGGATCTGGGCGATGGAGGAGACTCCGGAATCCTTGAAA
 ATCCTCCAATGAGAGAGGATATCCGAGATCAGGTATTGAAGATGAAAACAGAGAGATGGCTGCGCACCTTGATAAGAGGG
 GAGAAGACCAAGCTGAAGGACTTCCAGAAGAGGTACGAGGAGGTACATCCCTACCTGATGAAGGAGAAGGTGGAGCAAGTA
 ATAATGGAAGAAGCATGGAGCCTGGCAGCTCACATAGTGCAAGAGTAA

FIG. 7D

ADNc de M (SEQ ID NO: 10)

atggcagatatctatagattccctaagttctcatatgaggataacgggtactgtggagcccctgcctctga
 gaactgggtccagataagaaagccatcccctacatcaggattatcaaggtaggagaccctcctaacaatgg
 agtgagatacctagatttattgctcttgggtttctttgagacaccgaaacaaacaaccaatctaggggagc
 gtatctgacttgacagagccgaccagctactcaatatgctggctccgggtcgttacccataggtgtggcca
 aatactacgggactgatcaggaactcttaaggcctgcaccgatctcagaattacggtgaggaggactgt
 tcgagcaggagagatgatcgtatacatgggtggattcgtattggtgctccactcctaccatggtcaggcagg
 ctgagacaggggaatgatatttaatgcaacaaggctgcactagctccccaatgcctccctgtggacaagg
 acataagattcagagtggtgtttgtcaatgggacatctctaggggcaatcaccatagccaagatcccaaa
 gacccttgacagaccttgcatggcccaactctatataccgttaacctactgggtgacactcaagaccgggatc
 tccacagaacaaaaggggggtactcccagctacttgatgatcaagggggagaaaaagctcaattttatgggtgc
 acctcgggttgatcaggagaaaggctcgggaagatatactctgttgagtactgcaagagcaagattgagag
 aatgctggctgattttctcacttgggttaatcggcgggtataagcttccatgttcagggttactgggacacta
 tctaagacattcatgagtcagctcgcatggaagaggcagctctgcttccattaatggatgtgaaatccc
 atatgaacctgggtgatttggcgccatctgtagaaatcacaggcgtcgtatgctgggtgttccaaccggccat
 ccctcgtgatttccgctactaccctaattgttggctgaagaacatcgggaaggatcagaaagctgtaa

FIG. 7E

ADNc de F (SEQ ID NO: 12)

atgacagcatatatccagaggtcacagtgcatctcaacatcactactgggtgttctcaccacattgggtct
 cgtgtcagattcccagggataggctctctaacataggggtcatagtcgatgaagggaaatcactgaagat
 agctggatcccacgaatcgaggtacatagtagtctagttccgggggtagaccttgagaatgggtgc
 ggaacagcccaggttatccagtacaagagcctactgaacaggctgttaatcccattgagggatgccttag
 atcttcaggaggctctgataactgtcaccaatgatacgacacaaaatgccggtgttccacagtcgagatt
 ctccggtgctgtgattggtaactatcgcacttggagtggcgacatcagcacagatcaccgcagggattgca
 ctagccgaagcgagggaggccaaaagagacatagcgtcatcaaagaatcgatgacaaaaacacacaagt
 ctatagaactgctgcaaaacgctgtgggggaacaaattcttgctctaaagacactccaggatttctgtgaa
 tgatgagatcaaaccgcgaataagcgaattaggctgtgagactgctgccttaagactgggtataaaattg
 acacagcattactccgggctgttaactgcgttcggctcgaatttcggaaccatcggagagaagagcctca
 cgctgcaggcgtgtcttctacttactctgctaactactgagattatgaccacaatcaggacagggca
 gtctaactctatgatgtcatttatacagaacagatcaaaggaacgggtgatagatgtggatctagagaga
 tacatggttaccctgtctgtgaagatccctattctttctgaagtcccagggtgtctacacacaaggcat
 cgtctatttcttacaacatagacggggaggaatggatgtgactgtcccagccatatactcagtcgtgc
 ttctttcttaggggggtgcagacataaccgattgtgttgagtccagggtgacctatataatgccccagggat
 cccgcacaactgatacctgacagccagcaaaagtgtatcctgggggacacaacaagggtgtcctgtcacia
 aagttgtggacagccttatccccagtttgcttttgtgaatggggggcgttgttgcctaactgcatagcatc
 cacatgtacctgcgggacaggccgaagaccaatcagtcaggatcgtctaaagggtgtagtattcctaacc
 catgacaactgtggtcttataggtgtcaatggggtagaattgtatgctaaccggagagggcacgatgcca
 ctgggggggtccagaacttgacagtcggctcctgcaattgctatcagaccggttgatatttctctcaacct
 tgctgatgctacgaatttcttgcaagactctaaggctgagcttgagaaagcacggaaaatcctctctgag
 gtaggtagatggtacaactcaagagagactgtgattacgatcatagtagttatggctgtaaatattgggtgg
 tcattatagtgatcgtcatcgtgctttatagactcagaaggatcaatgctaattgggtaatccagatgaccg
 tataccgagggacacatatacattagagccgaagatcagacatatgtacacaaacgggtgggtttgatgca
 atggctgagaaaagatga

FIG. 7F

ADNc de HN (SEQ ID NO: 14)

atggatggtgatagg
 ggcaaacgtgactcgtactggtctacctctcctagtggttagcactacaaaattagcatcaggttgggaga
 ggtcaagtaaagttgacacatggttgctgattctctcattcaccagtgggctttgtcaattgccacagt
 gatcatctgtatcataatctctgctagacaagggtatagtatgaaagagtactcaatgactgtagaggca
 ttgaacatgagcagcagggaggtgaaagagtcacttacagctctaataaggcaagaggttatcgcaaggg
 ctgtcaacattcagagctctgtgcaaaccggaatcccagctctgttgaacaaaaacagcagggatgtcat
 ccagatgattgataagtcgtgcagcagacaagagctcactcagctctgtgagagtacgatcgagtcac
 catgccgaggggaattgccctcttgagccacatagttctggagatgccctgtcggagaaccgtatctta
 gctcagatcctaaaatctcattgctgcctgggtccgagcttggttctcaaacgatctctggatg
 tgttaggctccctcactctcaattggcgaggcaatctatgcctattcatcaaatctcattacacaaggt
 tgtgctgacatagggaaatcatatcaggtcctgcagctagggtacatatcactcaattcagatatgtcc
 ctgatcttaacccgtagtgtcccacacttatgacatcaacgacaatcggaaatcatgctctgtggtggc
 aaccgggactaggggttatcagctttgctccatgccgactgtagacgaaagaaccgactactctagtgat
 ggtatcgaggatctggtccttgatgtcctggatctcaaagggagcactaagtctcaccggatcgcaaca
 gcgaggtagatcttgatcaccgcttctctgcactatacccagtgtaggcaacggcattgcaacagaagg
 ctattgatatttcttgggtatggtgggctaaccacccctctacaggggtgatacaaaatgtaggacc
 caaggatgccaacaggtgtcgaagacacatgcaatgaggctctgaaaattacatggctaggagggaaacagg
 tggtcagcgtgatcatccaggtcaatgactatctctcagagaggccaaagataagagtcacaaccattcc
 aatcactcaaaactatctcggggcgggaaggtagattataaaattgggtgatcgggtgtacatctataca
 agatcatcaggctggcactctcaactgcagataggagtacttgatgtcagccaccctttgactatcaact
 ggacacctcatgaagccttgcttagaccaggaatgaagagtgaattggtacaatacgtgtccgaagga
 atgcatatcaggcgtatacactgatgcttatccattgtcccctgatgcagctaacgtcgtaccgtcacg
 ctatatgccaatacatcgcgtgtcaaccaacaatcatgtattcctaactactaactataaataatgt
 taaggataaaggatgttcaattagaggctgcatataaccagacatcgtgtatcacgcattttggtaaagg
 ctactgctttcacatcatcgagatcaatcagaagagcctgaataccttacagccgatgctctttaagact
 agcatccctaaattatgcaaggccgagctctta

FIG. 7G

ADNc de L (SEQ ID NO: 16)

atggatgggcaggag
 tcctcccaaaacccttctgacatactctatccagaatgccacctgaactctccatagtcagggggaaga
 tagcacagttgcacgtcttggtagatgtgaaccagccctacagactgaaggacgacagcataataaatat
 tacaagcacaataataggaacggaggattgtccccctgcaaatgaagatcaggtctctgggtaaggct
 cttcaacgcacaataaaggatttagaccgatacacgttgaaccgtacccaacctactctcaggaattac
 ttaggcttgatataccagagatatgtgacaaaatccgatccgtcttcgcggtctcggatcggctgaccag
 ggagttatctagtgggtccaggatctttgggtgaatatcttcaagcaactaggcaatatagaaggaaga
 gaggggtacgatccgttgaggatcggcaccatcccggagataactgataagtacagcaggaatagat
 ggtataggccattcctaacttggttcagcatcaaatatgacatgcggtggatgcagaagaccagaccggg
 gggacccttgatacctctaattcacataacctctagaatgcaaatcatacactctagtaacatacggga
 gatcttgcagatgatactgaacaagttgacattgacagggtatatcctaaccctgagctgggtcttgatgt
 attgtgatgtttagaaggaaggtggaatatgtctgctgcaggcatctagataagaagtcattgggat
 aacaagcaaaggtgaggaattatgggaactagtgattccctcttcaagtcttggagaggaataatatac
 aatgtcatcgcactattggagcccctatcacttgctctcacaactaaatgatcctgttatacctctac
 gtggggcatttatgaggcatgtgtgacagagctacagactgttttaacaagtagagacgtgtacacaga
 tgctgaagcagacactattgtggagtcggtactcgccattttccatggaacctctattgatgagaaagca
 gagatctttccttctttaggacattggccaccccagcttagaggctgtcactgcccgcgacaaggtaa
 gggccatattgatgcacaaaaggcaataaagcttaagacctatacagatgtcatgcagtttttgcac

FIG. 7H

tatcatcataaatgggtatagagagaggcatggcggacagtggcccccctgtgacttccctgatcacgtg
 tgtctagaactaaggaaacgctcaagggtccaatacggcaatctcttatgaatgtgctgtagacaactata
 caagtttcataggcttcaagtttccggaagtttatagaaccacaactagatgaagatctcacaatatata
 gaaagacaaagcactatccccaggaaggaggcatgggactctgtataaccggatagtaatctgtactat
 aaagcccagagtctgaagagaccggcggcttattgaagtgttcataaatgatgagaatttcaaccag
 aagaattatcaattatgtggagtccaggagattggttgaagacgaggagttcaacatctcgtacagtct
 caaagagaaagagatcaagcaagagggtcgtctattcgcataaatgacttataagatgagcagcgtacag
 gtgctggcagagacactactggctaaaggaataggagagctattcagggaaaatgggatggttaaggag
 agatagacctacttaaaagattgactactctttctgtctcaggcgtcccaggactgattcagtgtaaa
 taactctaaatcatcagagaagagaaacgaaggcatggaaaataagaactctggggggtactgggacgaa
 aagaagagggtccagacatgaattcaaggcaacagattcatcaacagacggctatgaaacgttaagtgtct
 tcctcaaacagacctcaagaaatactgcttaactggagatttgagagtactgattgtttggtcagag
 atgcaacgagatatttggcttcaagacctcttaactggatgcatccagtccttgaagggtgtacaata
 tatgttggagatccttactgtccagtcgcccagcggatgcatcgacaactccaggatcatgcagactctg
 gcatttccatacataatcctagggggggcatagaagggtactgcccagaagctgtggaccttaactcaat
 cagtgaacccactagcagctgtgagagtgggtgtcagggtctctgcaatgggtcagggtgacaatcaa
 gctatagccgtgacatcaagagtacctgtagctcagacttacaagcagaagaaaatcatgtctatgagg
 agatcaccaaatatttccggtcttaagacacgtcatgtttgatgtagggcacgagctaaaattgaacga
 gaccatcattagtagcaagatgtttgtctatagtaaaaggatatactatgatgggaagattttaccacag
 tgcctgaaagccttgaccaagtgtgtattctggctccgagacactggtagatgaaaacagatctgcttgtt
 cgaacatctcaacatccatagcaaaagctatcgaaaatgggtattctctatactaggctactgcattgc
 gttgtataagacctgtcagcagggtgtgcatatcactagggtgactataaatccaactatcagcccgacc
 gtaagagatcaatactttaagggtagaattggctgagatgtgcagtgttgattccagcaaatgttggag
 gattcaactacatgtctacatctagatgctttgttagaaatattggagaccccgcagtagcagccctagc
 tgatctcaaaagattcatcagagcggatctgttagacaagcaggtattatacagggtcatgaatcaagaa
 cccggtgactctagtttctagattgggcttcagaccttattctgtgtaacctcccgcatttctcagagta
 taactacgattataaagaatatactgctagatctgtgctgcaggaatccccgaatctctactgtctgg
 tctcttaccgagactagtggagaagaggatctcaacctggcctcgttcttattggaccggaagtcac
 ctgcccagagtggtctcatgagatcctgggtaattccttaactggagttaggaggcagattgcagggatgc
 ttgatacgaccaagtctctagtgagagccagcgttaggaaaggaggattatcatatgggatattgaggag
 gcttgtcaattatgatctattgcagtagcagacactgactagaactctcaggaacccggtgaaagacaac
 atcgaatatgagtataatgtgttcagttgagctagctgtcggctcaaggcagaaaatgtggatccacctga
 cttacgggagaccatacatgggttagaaacaccagacctttagagctcttgagggaatattttatcga
 aggttcagaggtgtgcaagcttgcaggctgaaggagcagaccatctatacatggttctatcttctc
 gacaatatagacctggacacgcttacaacggatgtccggctataagaatcccctattttggatcagcca
 ctgatgaaaggctcggaagcccaactcgggtatgtaagaaatctaagcaaacccgcaaggcggccatccg
 gatagctatggtgtatactggtgctacgggactgatgagatctgtggatggaagccgctcttatagcc
 caaacaagagctaactgagcttagagaatctaaagctgtgactcctgtttcaacctccactaatctat
 ctcataggttgaagatacggcaaccagatgaagttctctagtgcaacactagtcctgtgcaagtgggt
 catacaatatcaaatgataacatggcactcaagaagcaggggagtcaaggatactaatctcgtgtat
 cagcagattatgctaactgggctaagcttgttcagttcaatagatataagaaggttcccttaggga
 agccactgatattgcacttacatcttaataacgggtgctgtataatggagtcccacaggaggcgaatat
 cccccaaggtccacattagatttagagattacacaagagaacaataaattgatctatgatcctgatcca
 ctcaaggatgtggaccttagctatttagcaagggtcagagatgttgtacatacagttgacatgacttatt
 ggtcagatgatgaagttatcagagcaaccagcatctgtactgcaatgacgatagctgatacaatgtctca
 attagatagagacaacttaaaagagatgatcgactagtaaatgacgatgatgtcaacagcttgattact
 gattttatggtgattgatgttctttatatttctcaacgttccgggggtattctagtcaatcagtttgc
 actcactctacggcttaaacatcagaggaagggaagaaataggggacatgtagtcgggattcttaaga
 tacctcccacgagttctaaaagtcttatctaatgtctatcccataccaaaatcttcaaacgattctgg
 aatgcagggtgtcgtggaacctgtgtatgggcctaacctctcaaatcaggataagatactcttggccctc
 ctgtctgtgaatattctgtggatctattcatgcagactggcaagggggtgaccgcttgagatctttat
 ctgtgacaatgaccagatgtggccgacatgaggaggtcctcttcttggcaagacatcttgcataccta

FIG. 7Hcontinuación

tgcagcttggcagagatatctagggatgggccaagattagaatcaatgaactctctagagaggctcgagt
 cactaaagagttacctggaactcacatttcttgatgacccgggtactgagggtacagtcagttgactggcct
 agtcatcaaagtattcccatctactttgacctatatccggaagtcatctataaaagtgttaaggacaaga
 ggtataggagtccttgaagtcttagaagattgggatcccaggcagataatgcactgttagatgggatc
 cggcagaaatacaacagaatattcctttgggacatcagactagagccctttttgggggttgagagtatc
 caagtcacaggtactgcgtctccgggggtacaaggagatcacaaagggtgagataggcagatcaggtgtt
 ggtctgacgttaccattcgatggaagatatctatctcaccagctgaggctctttggcatcaacagtacta
 gctgcttgaagcacttgaacttacctacctattgagccccttagttgacaaggataaagataggctata
 tttaggggaaggagctggggccatgctttcctgttatgacgctactcttggcccagatcaactattat
 aactcaggggtatactcttgtgatgtcaatgggcagagagagttaaatatatatcctgctgaggtggcac
 tagtgggaaagaaattaaacaatgttacttagtctgggtcaaagagttaaagtgttattcaacgggaatcc
 tggctcgacatggattgggaatgatgagtgaggctttgatttgggaatgaattacagaatagctcgata
 ggcctagtccactgtgacatggagggaggagatcataaggatgatcaagttgtactgcatgagcattaca
 gtgtaatccggatcgctatctggtgggggatcgagacgttgtgcttataagcaagattgctcccaggct
 gggcacggattggaccaggcagctcagcctatatctgagatactgggacgaggttaacctaatagtgtt
 aaaacatctaaccctgcttccacagagatgtatctctatcgaggcaccctaaatctgacattatagagg
 acagcaagacagtgtagctagctctcctcctttgtcaaaagaagatagcatcaagatagaaaagtggt
 cttaatagagaaggcaaaggctcacgaatgggttactcgggaattgagagaaggaagctcttcatcaggg
 atgcttagaccttaccatcaagcactgcagacgtttggctttgaaccacttgtataaattgagcagag
 atttcttgtccaccatgaacatagctgatacacacaactgcatgatagctttcaacagggttttgaagga
 tacaatcttcgaatgggctagaataactgagtcagataaaaggcttaactaactggtaagtatgacctg
 tatcctgtgagagattcaggcaagttgaagacaatttctagaagacttgtgctatcttggatattttat
 ctatgtccacaagattggtaactgggtcattccctgaccagaagtttgaagcaagacttcaattgggaat
 agtttcattatcatcccgtgaaatcaggaacctgagggttatcacaaaactttattatacaggtttgag
 gatattatacatagtataacgtatagattcctcaccaaagaaataaagattttgatgaagattttagggg
 cagtcaagatgttcggggccaggcaaaatgaatacacgaccgtgattgatgatggatcactaggtgat
 cgagccatattgacagctcgtataataattagtcctatc

FIG. 7H continuación

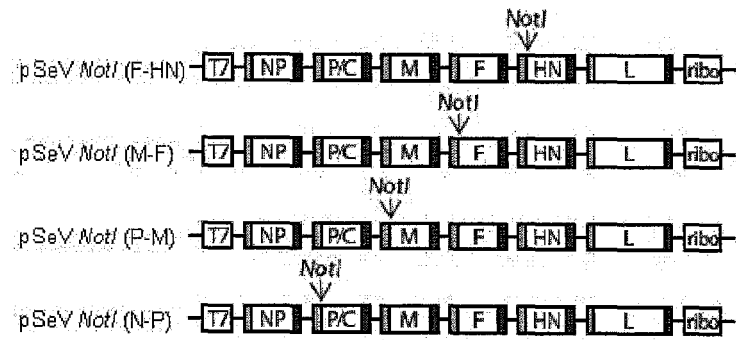


FIG. 8

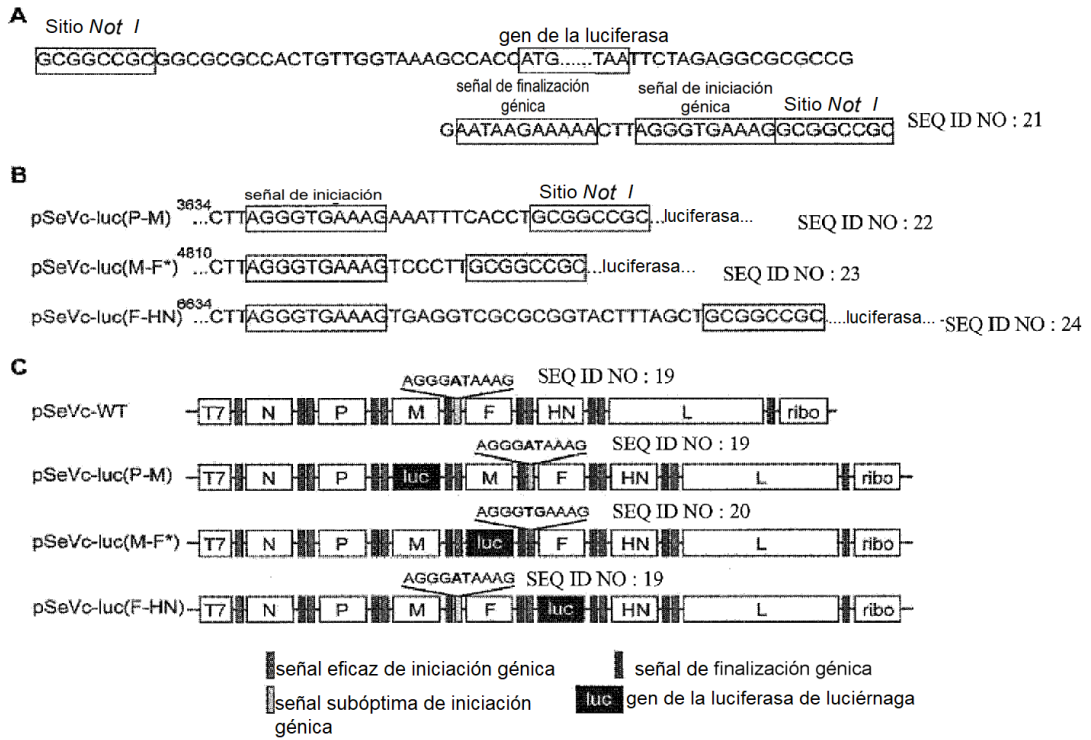


FIG. 9

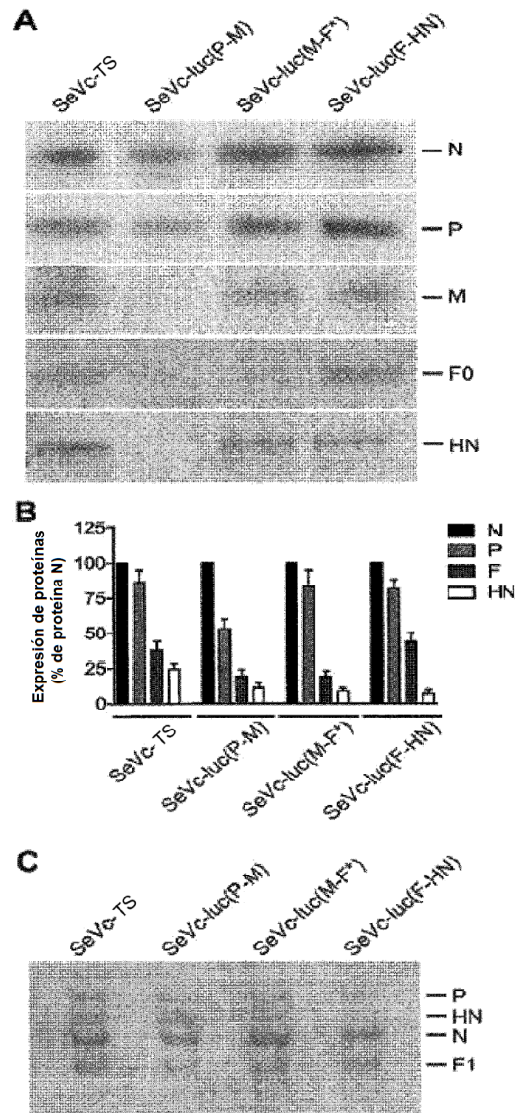


FIG. 10

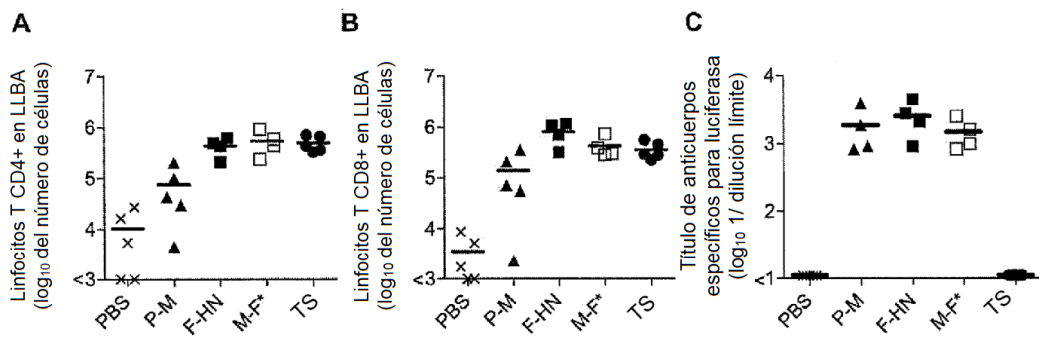


FIG. 11

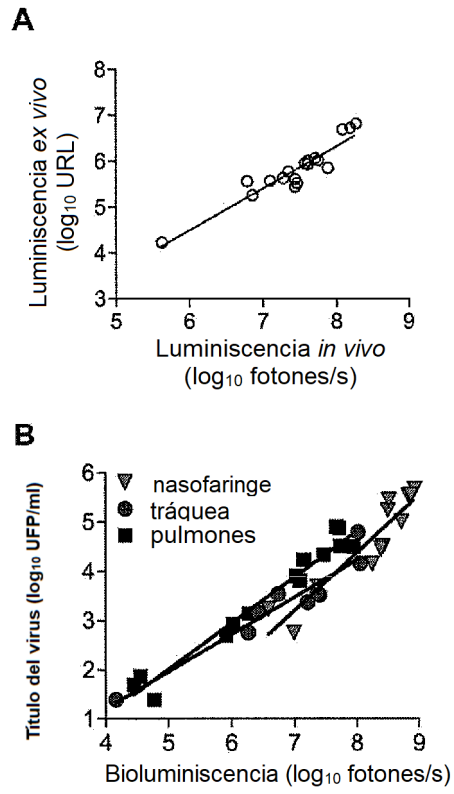


FIG. 12

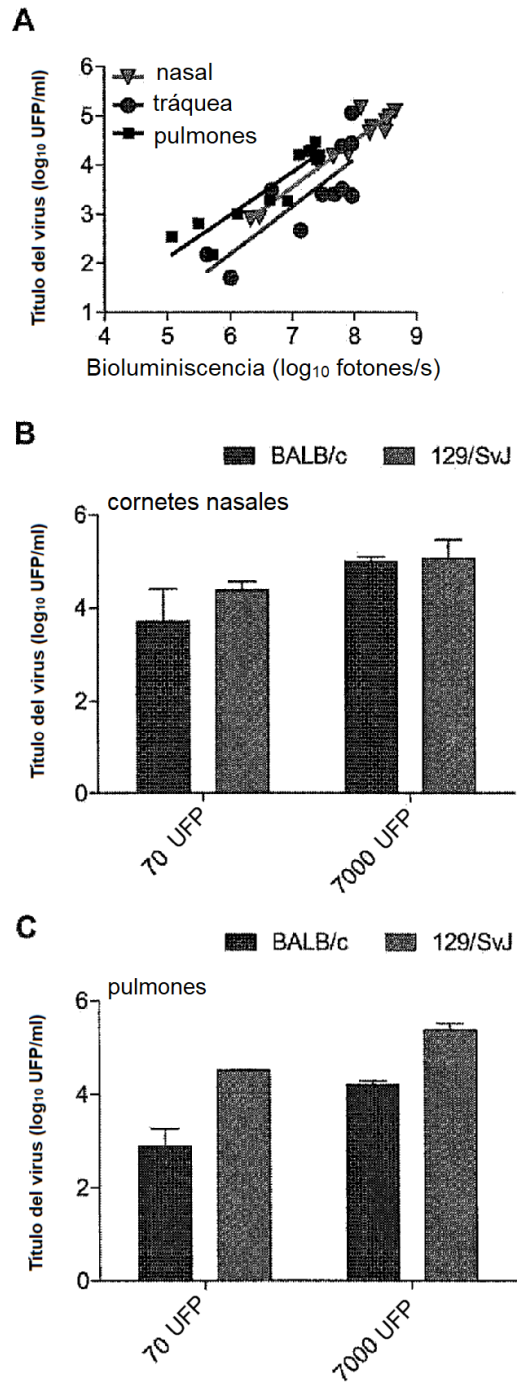


FIG. 13

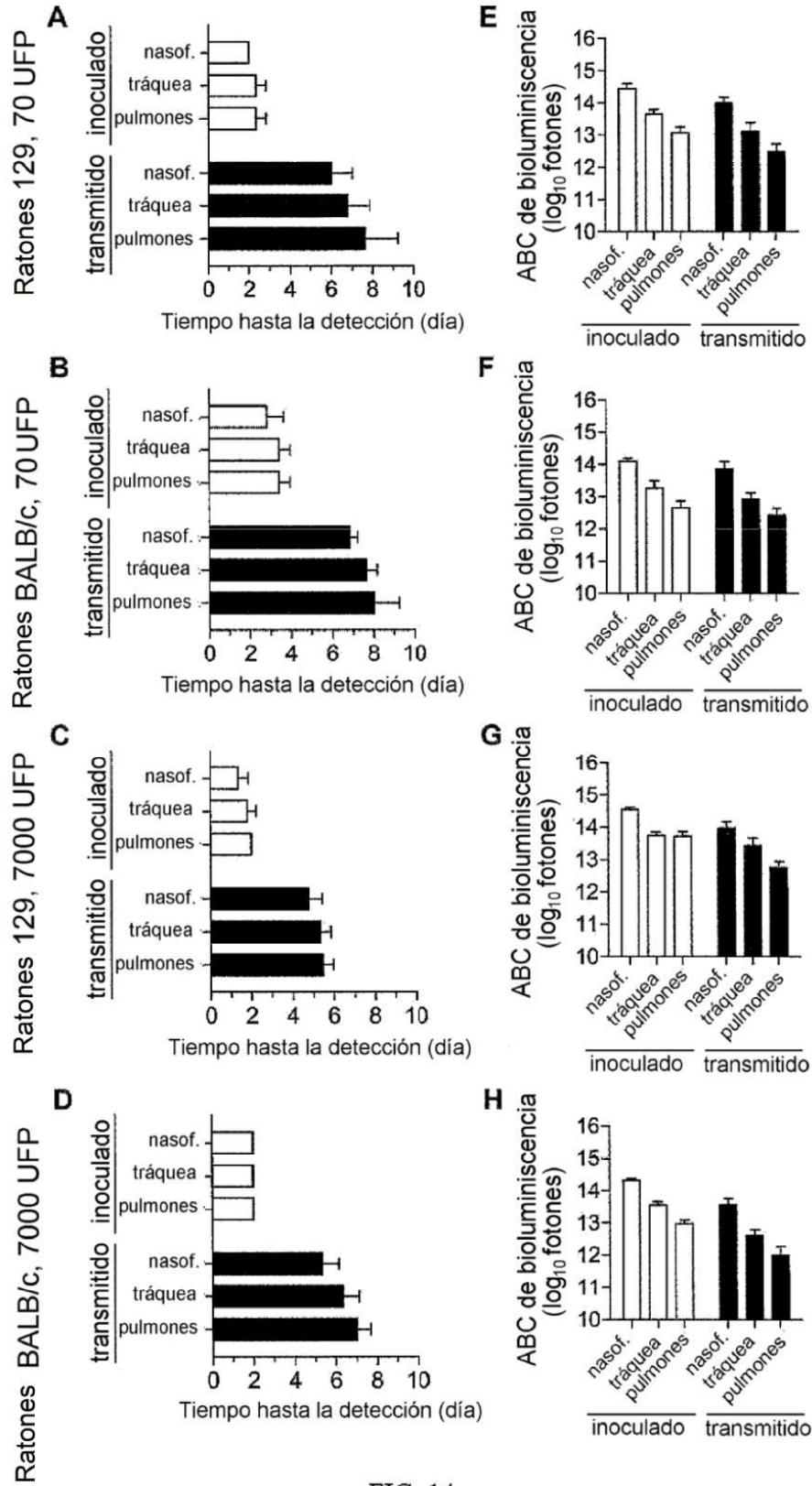


FIG. 14

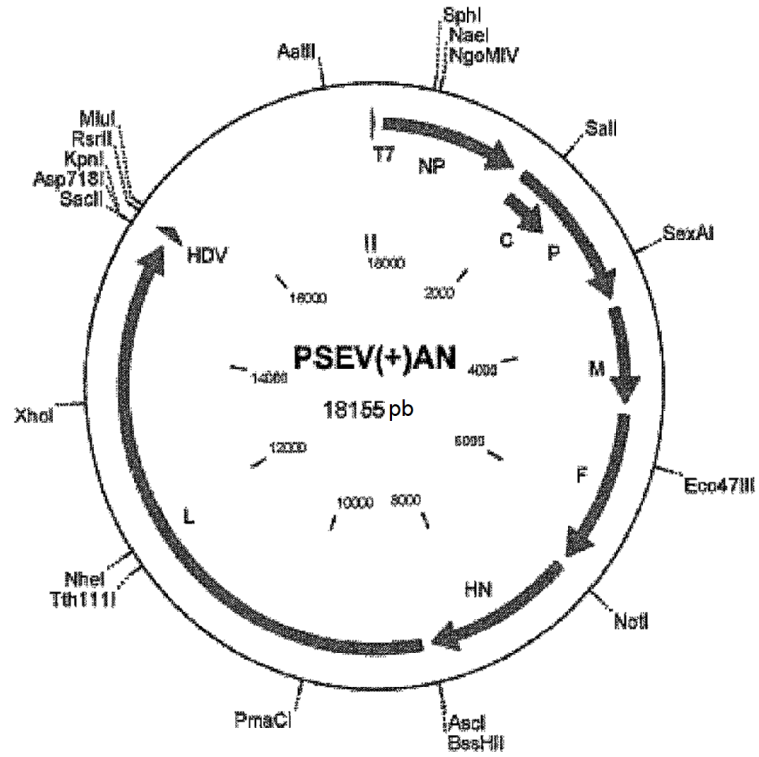
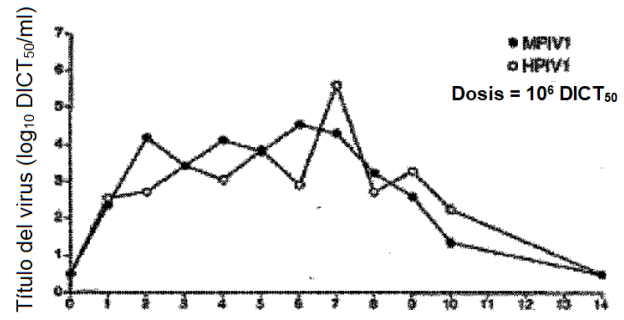


FIG. 15

A
VRS



B
VRI

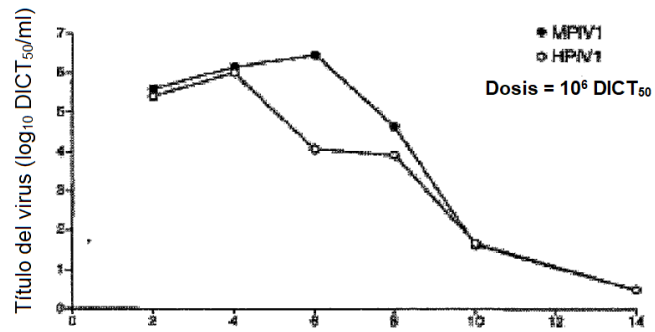


FIG. 16

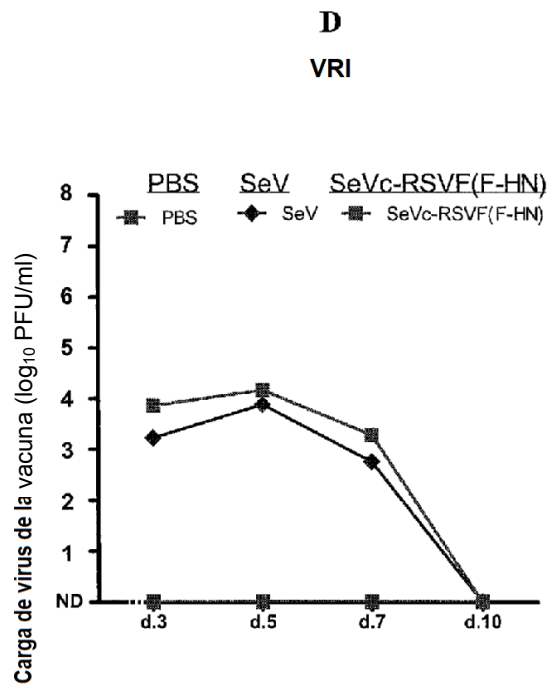
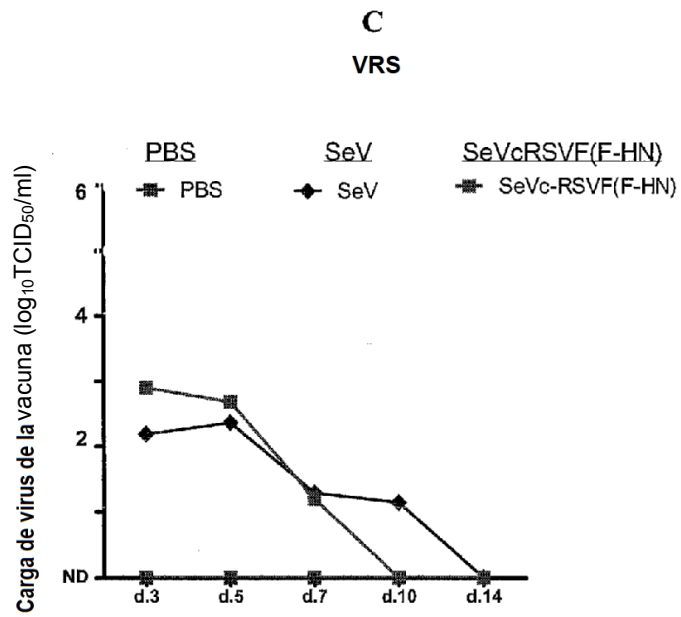


FIG. 16 continuación

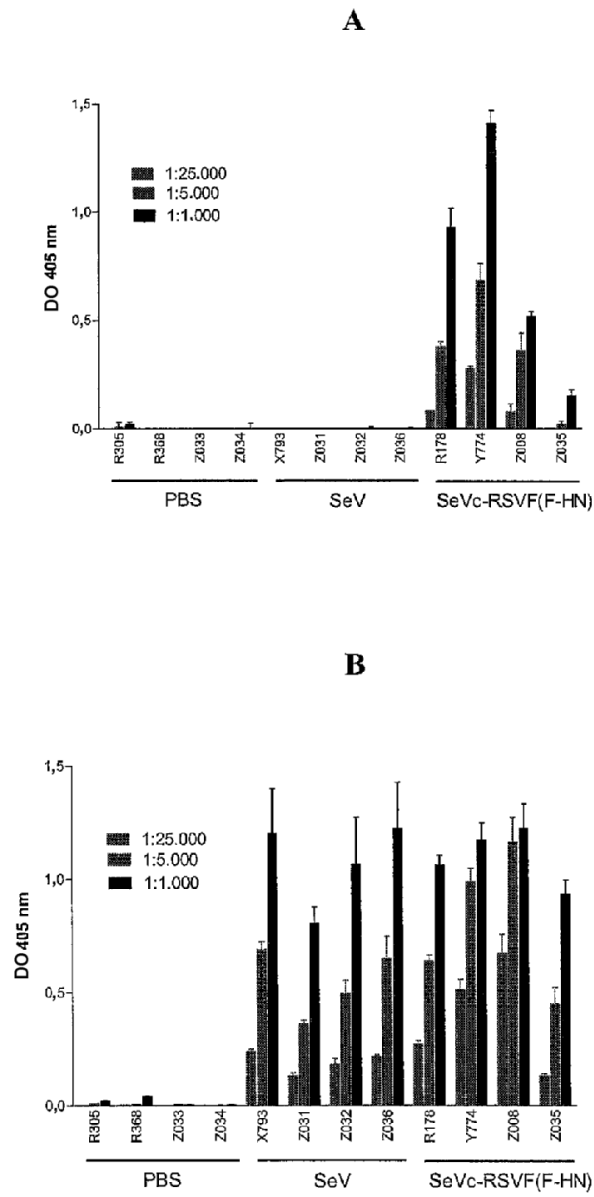


FIG. 17

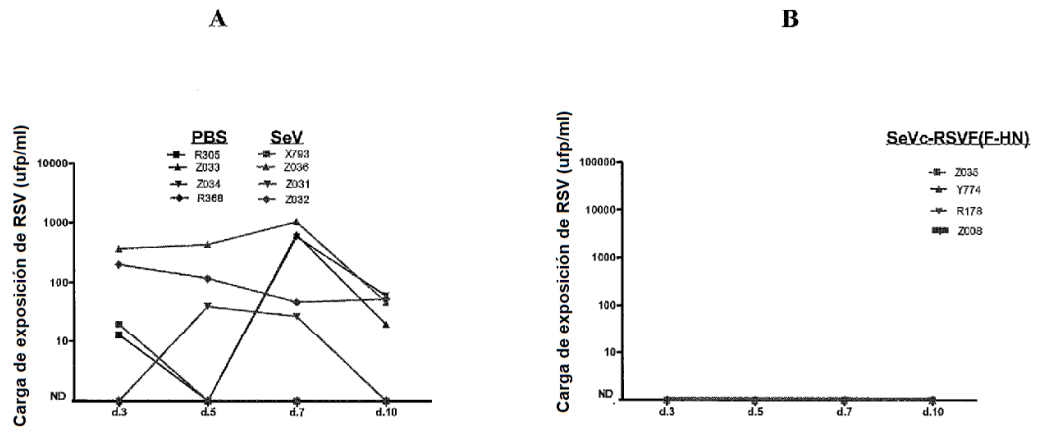


FIG. 18

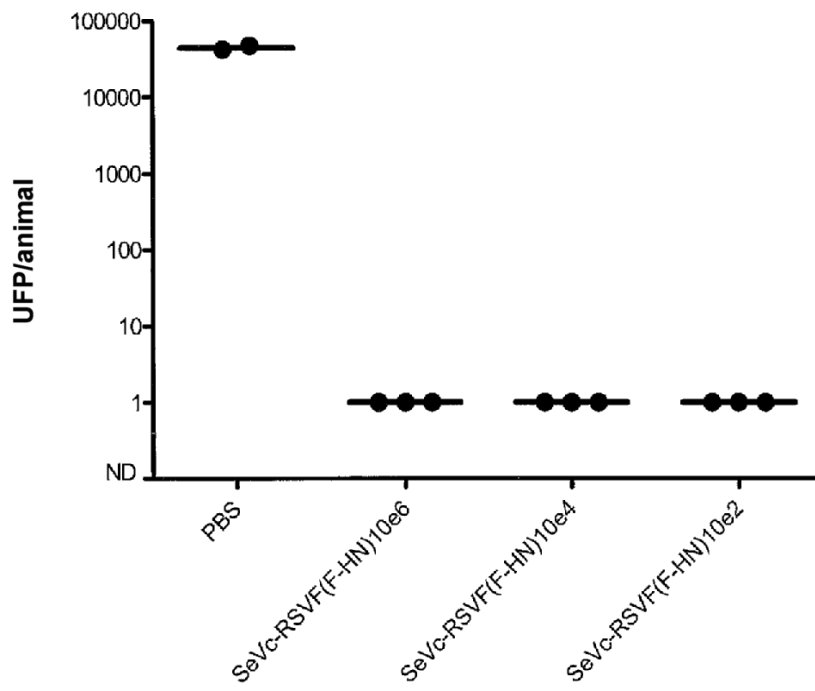


FIG. 19