Castillo Grau & Asociados
ABOGADOS

165
00169

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00003425 00000001
Fecha (AMD): 2000-04-14 09:42:58 Folios: 157
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2229 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señor Jefe
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Santafé de Bogotá, D.C.

RE.: Expediente No. 00 3.425
Solicitud de patente a nombre de
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS s.a.
Código 02 - 01 - 08

En relación con la solicitud contenida en el expediente de la referencia y en particular para dar respuesta a su última providencia proferida dentro del mismo, por medio del presente escrito me permito manifestarle:

1.- El capítulo reivindicatorio ha sido revisado y corregido, conforme a lo cual:

- El término "condón o condones" ha sido modificado por el término correcto.

- Se ha incluido tanto en la descripción como en las reivindicaciones correspondientes la definición de las siglas s^+, s^- y a^-.

- Mi representada me ha dado instrucciones de mantener la reivindicación 21, por cuanto la misma tiene sus-

PROTEINAS HETEROQUIMERICAS DE PARAMIXOVIRUS RECOMBINANTES PARA TRASTORNOS RESPIRATORIOS Y METODOS DE PREPARACION

La presente invención se refiere a glicoproteínas heteroquiméricas de paramixovirus recombinantes y a su expresión en células eucariotas, particularmente en células de Ovario de Hámster Chino (CHO). La invención se refiere además a procedimientos para construir y expresar tales proteínas heteroquiméricas, a intermedios para uso en los mismos, a procedimientos para optimizar el uso de codones de las secuencias de ácido nucleico que codifican tales proteínas heteroquiméricas y al uso de las proteínas recombinantes como vacunas para la prevención de enfermedades provocadas por patógenos del grupo de los paramixovirus.

Los virus de la parotiditis (MuV), el sarampión (MV), la parainfluenza de tipo I (PIV1), de tipo II (PIV2) y de tipo III (PIV3) y el virus sincitial respiratorio (RSV) pertenecen a la familia de los paramixovirus. El MuV se clasifica en la subclase de los rubulavirus, el MV se clasifica en la subclase de los Morbillivirus, los virus de la parainfluenza (PIV1, PIV2 y PIV3) se clasifican en la subclase de los paramixovirus, mientras que el RSV se asocia a la subclase de los neumovirus.

El RSV es la causa más importante de enfermedad viral en el tracto respiratorio inferior en bebés y niños. La

proteína de fusión (F) y de unión (G), que son glicoproteínas superficiales del virus, parecen ser de un valor potencial para el desarrollo de una vacuna contra el RSV.

La proteína de fusión F de RSV contiene 574 restos aminoácidos; los aminoácidos 1 a 21 corresponden al péptido señal y los péptidos 525 a 549 al dominio de anclaje a la membrana. La molécula presenta cinco sitios potenciales para la glicosilación. La proteína F se sintetiza como un precursor de 70 kDa (F_0) que sufre una maduración proteolítica para producir la subunidad F_1 (48 kDa) y F_2 (23 kDa) unidas mediante enlaces disulfuro. La proteína F, cuando se inyecta en animales, conduce a la producción de anticuerpos neutralizadores y puede inducir linfocitos citotóxicos (CTL).

La proteína G o de unión de RSV contiene 298 restos aminoácidos y está muy glicosilada, ya que la mitad de su masa molecular (90 kDa) se debe a las cadenas laterales de oligosacáridos, principalmente en forma de azúcares O-unidos. Se ha demostrado que la proteína G, cuando se inyecta en animales, proporciona protección contra la exposición a virus de subgrupos homólogos pero no heterólogos. Esta proteína es extremadamente variable y sólo hay un tramo de 13 aminoácidos que se conserva en todos los RSV.

El PIV3 es secundario al RSV como agente importante en las infecciones virales graves en el tracto respiratorio de los bebés. La proteína de fusión F de PIV3 contiene 539 restos aminoácidos; los aminoácidos 1 a 18 corresponden al péptido señal y los restos 494 a 516 al dominio de anclaje a la membrana. La molécula presenta 4 sitios potenciales para la glicosilación. La proteína F se sintetiza como un precursor de 70 kDa (F_0) que sufre una maduración proteolítica para producir las subunidades F_1 (de 56 kDa) y F_2 (de 14 kDa) unidas a través de enlaces disulfuro. La proteína F, cuando se inyecta en animales, conduce a la producción de anticuerpos neutralizadores. La proteína F está implicada en la fusión celular durante la infección viral y lleva una actividad hemolisina. Usada sólo para inmunización, la proteína F genera una respuesta inmune que es insuficiente como para conferir protección contra una exposición al virus. La protección completa sólo se adquiere mediante la inmunización concomitante con la proteína de unión HN, otra glicoproteína de PIV3.

La proteína HN lleva actividades de hemaglutinina y neuraminidasa. Se compone de 572 aminoácidos; su dominio de anclaje a la membrana aparece en el extremo N-terminal de la molécula, entre los restos aminoácidos 32 y 53. Se han identificado cuatro sitios potenciales para la glicosilación. La inyección de la proteína HN en animales

genera una respuesta inmune y anticuerpos neutralizadores. Sin embargo, estos anticuerpos no protegen completamente contra una exposición al virus. La protección completa se obtiene sólo mediante la inmunización concomitante con la proteína F de PIV3.

El virus PIV1 se aisló inicialmente a partir de niños pequeños que sufrían trastornos del tracto respiratorio inferior. La infección con PIV1 provoca la mayor parte de los casos de crup encontrados para todas las infecciones causadas por paramixovirus. La transmisión viral de PIV1 es por el contacto entre personas o por un aerosol, aunque el virus no persiste en el medio durante un largo período de tiempo.

A igual que PIV2 y PIV3, el virus PIV1 tiene dos glicoproteínas superficiales, la proteína de fusión (F) y la proteína de unión (HN). Estas dos proteínas son las dianas prioritarias para el desarrollo de una vacuna de subunidades, cuyas propiedades serían asegurar la protección de los niños desde los primeros meses de vida y prevenir la reinfección, o al menos prevenir las complicaciones graves restringiendo el desarrollo viral en el tracto respiratorio superior, donde las consecuencias serían benignas (un resfriado común).

PIV2 también afecta a niños muy pequeños y causa el mismo tipo de trastornos respiratorios, esencialmente crup,

pero de menor gravedad. El virus PIV2 tiene dos glicoproteínas superficiales (F y HN), que son dianas potenciales para el desarrollo de una vacuna de subunidad.

El virus del sarampión es un agente extremadamente contagioso que se establece por sí mismo en las células epiteliales del tracto respiratorio, la orofaringe o la conjuntiva. La infección provoca fiebre, tos, resfriado de cabeza, conjuntivitis y un exantema característico generalizado.

No hay una vacuna inactivada apropiada contra el sarampión, pero se dispone de una vacuna viva atenuada eficaz y generalmente se usa en combinación con las vacunas vivas atenuadas contra la rubéola y la parotiditis. Esta vacuna viva protege contra la enfermedad durante al menos 20 años. El virus del sarampión tiene dos glicoproteínas superficiales, que son dianas potenciales para el desarrollo de una vacuna de subunidad. La proteína de fusión (F) es una molécula glicosilada con una longitud de 550 aminoácidos y, como para los otros paramixovirus, tiene que sufrir una escisión proteolítica para producir subunidades F_1 y F_2 que se unen a través de enlaces disulfuro. Esta molécula, que lleva una actividad hemolisina, genera una respuesta protectora inmune cuando se inyecta en los animales. La proteína de unión (H) es una proteína glicosilada con una longitud de 617 aminoácidos,

que lleva una actividad de hemaglutinina. Esta proteína, cuando se inyecta en animales, conduce a la producción de anticuerpos neutralizadores que pueden inhibir la hemaglutinación. Esta respuesta inmune protege al animal contra una exposición viral.

El virus de la parotiditis es un patógeno que causa la enfermedad infantil contagiosa que consiste en la inflamación de las glándulas parótidas. Durante el período de incubación posterior a la infección, el virus se replica en el epitelio respiratorio y después se disemina dentro de los conductos secretores de las glándulas parótidas. Posteriormente pueden infectarse otras glándulas y se han presentado numerosos casos de meningitis. Entre las complicaciones relacionadas con la infección, la encefalitis es una complicación grave, con una tasa de mortalidad de aproximadamente un 1%; también se han presentado casos de sordera.

Se dispone de una vacuna contra la parotiditis: se compone de un virus vivo atenuado, producido mediante el cultivo de células embrionarias de pollo infectadas. La vacuna conduce a la seroconversión en individuos vacunados y protege contra la infección en más de un 95% de personas seronegativas. Así pues, la vacuna reduce significativamente la frecuencia de complicaciones.

Sin embargo, en varios casos la infección viral no se

detecta porque los efectos se mantienen subclínicos. Los niños pequeños y las personas de edad avanzada son más propensos a desarrollar complicaciones por la infección de parotiditis. En vista de los riesgos inherentes relacionados con el uso de las vacunas vivas atenuadas, tales como la potenciación de la enfermedad tras una surinfección natural en individuos vacunados, es deseable mejorar la seguridad de la vacuna, particularmente para los grupos de riesgo.

La proteína de fusión F del virus de la parotiditis contiene 538 restos aminoácidos; los aminoácidos 1 a 26 corresponden al péptido señal y los restos 483 a 512 al dominio de anclaje a la membrana. La molécula presenta 7 sitios potenciales para la glicosilación. La proteína F se sintetiza como un precursor de 65-74 kDa (F_0) que sufre una maduración proteolítica para producir las subunidades F_1 (58-61 kDa) y F_2 (10-16 kDa) unidas mediante enlaces disulfuro. La proteína F está implicada en la fusión celular durante la infección viral, lleva una actividad hemolisina y juega un papel para la penetración viral en las células. Sin embargo, no lleva la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que se observa en otras glicoproteínas del virus de la parotiditis, HN.

La proteína HN (con un peso molecular de 74 a 80 kDa) lleva actividades de hemaglutinina y neuraminidasa que

están implicadas en la unión del virus a las células y en la destrucción de las membranas de las células hospedadoras. La proteína HN (proteína de unión o hemaglutinina-neuraminidasa) genera anticuerpos neutralizadores y parece ser importante para el desarrollo de la ADCC. La proteína HN está compuesta de 582 aminoácidos; lleva un dominio de anclaje N-terminal (restos 33 a 52) y 9 sitios potenciales para la glicosilación.

Para los virus considerados anteriormente, parece ser que se requiere la inmunización conjunta con las dos glicoproteínas de membrana F y HN, o G en el caso de RSV, para conseguir una protección completa en el modelo animal. Las proteínas quiméricas que contienen tanto la proteína F como la proteína G de RSV, o las proteínas F y HN de PIV3, han demostrado una protección completa contra la exposición a RSV o PIV3 en ratas de algodón (Brideau y col., J Gen Virol, 1989, 70 2637-2644 y Brideau y col, J Gen Virol, 1993, 74, 471-477).

El documento WO9314207 (Connaught) describe proteínas heteroquiméricas que comprenden proteínas de RSV y PIV3 que incluyen híbridos F(RSV)xHN(PIV3) y F(PIV3)xG(RSV), y sugiere que tales proteínas pueden expresarse en una diversidad de células hospedadoras incluyendo células bacterianas, de mamífero, de insecto, de levadura y fúngicas. Los ejemplos específicos describen la expresión

en células Sf9 y High 5 de insectos y en células Vero de mamíferos. No hay ninguna descripción específica del uso de las células CHO. El uso de las células Sf9 y High 5 también se describe por Du y col., BIO/TECHNOLOGY 12, 1994, 813-818.

Homa y col (Upjohn), J. Gen Virol, 1993, 74, 1995-1999, describe otra proteína heteroquimérica, F(RSV)xHN(PIV3), expresada en células de insectos usando un baculovirus recombinante.

En algunos trabajos se han descrito proteínas homoquiméricas de paramixovirus:-

El documento WO8905823 (Upjohn) describe híbridos FSV FxG y GxF que pueden expresarse en células bacterianas, de levadura, de mamíferos y de insectos. El Ejemplo 7 describe la expresión de una proteína RSV FxG en células CHO, aunque no hay detalles de lo satisfactoria que es la expresión.

El documento WO8910405 (Upjohn) describe híbridos PIV3 FxHN y HNxF que pueden expresarse en células bacterianas, de levadura, de mamíferos y de insectos. El Ejemplo 6 describe la expresión de una proteína PIV3 FxHN en células CHO, sin embargo no se proporcionan detalles que cuantifiquen el grado de expresión y de secreción.

Lehman y col (Upjohn), J Gen Virol, 1993, 74, 459-469, describe la expresión de PIV3 FxHN en células de insecto usando vectores de baculovirus recombinante, así como en

células CHO.

El documento WO9306218 (SmithKline Beecham Biologicals) describe híbridos PIV3 FxHN que pueden expresarse en células eucariotas, incluyendo células vaccinia, CHO o Vero. El Ejemplo B) 2 describe la expresión de un híbrido $Fs^{+}a^{-}xHNa^{-}$ en células CHO e indica que el producto se distribuyó casi uniformemente entre las células y el medio. Sin embargo, no se proporcionan detalles que cuantifiquen el grado de expresión y de secreción.

El documento WO9425600 (SmithKline Beecham Biologicals) describe híbridos MuV FxHN y HNxF que pueden expresarse en vaccinia, una célula de mamífero (tal como CHO) o una célula bacteriana. Los Ejemplos B) 3 y 4 describen la expresión de $s^{+}FHNa^{-}xFa^{-}$ y $Fs^{+}a^{-}xHNa^{-}$ en células CHO, sin embargo, no se proporcionan detalles que describan el grado de expresión y de secreción.

Aunque esta técnica citada puede sugerir que las glicoproteínas de paramixovirus homoquiméricas pueden expresarse en una diversidad de líneas celulares incluyendo células CHO, ahora se ha descubierto que, de hecho, la expresión y secreción en células CHO no siempre es satisfactoria y que no puede predecirse el éxito. Así pues, ahora se ha demostrado que aunque el híbrido RSV F x G puede expresarse y secretarse satisfactoriamente en células CHO, podrían no expresarse híbridos homoquiméricos análogos

de PIV3 y MuV en células CHO de tal manera que pudieran purificarse del sobrenadante en cantidades significativas.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que los híbridos heteroquiméricos pueden expresarse y secretarse satisfactoriamente tanto en células CHO como en células de insecto.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una proteína heteroquimérica o un derivado inmunogénico de la misma, que comprende un fragmento inmunogénico de la proteína de fusión (F) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV y un fragmento inmunogénico de la proteína de unión (G, HN o H) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MuV o MV, procedimiento que comprende la expresión de un ADN recombinante que codifica la proteína inmunoquimérica o un derivado inmunogénico de la misma en células CHO, y la recuperación de la proteína.

Por proteína heteroquimérica se entiende una que no contiene una proteína de fusión o de unión del mismo patógeno.

Esta invención también proporciona nuevas proteínas heteroquiméricas no descritas previamente en el documento WO 9314207, que pueden prepararse usando el procedimiento de la presente invención.

Así pues, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona una proteína heteroquimérica o un derivado

inmunogénico de la misma, que comprende un fragmento inmunogénico de la proteína de fusión (F) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV y un fragmento inmunogénico de la proteína de unión (G, HN o H) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MuV o MV, con la condición de que cuando uno de los fragmentos inmunogénicos procede de RSV F, RSV HN o PIV3F, PIV3 HN, el otro fragmento inmunogénico procede de MuV F, Muv HN, MV F, MV H, PIV1 F, PIV1 HN, PIV2 F o PIV2 HN.

Por fragmento inmunogénico de la proteína de fusión (F) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV, se entiende una parte de la proteína que contiene al menos un determinante antigénico capaz de producir una respuesta inmune específica para la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV, respectivamente. Dentro de esta definición se incluye la proteína F de longitud completa, sin embargo, preferiblemente, el fragmento inmunogénico carece del dominio de anclaje a la membrana en su extremo C-terminal.

Por fragmento inmunogénico de la proteína de unión (G, HN, o H) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MuV o MV, se entiende una parte de la proteína que contiene al menos un determinante antigénico capaz de producir una respuesta inmune específica para la proteína G de RSV, para la proteína HN de PIV1, PIV2, PIV3, MuV o la proteína H de MV, respectivamente. Dentro de esta definición se incluye la proteína G o HN de longitud completa, sin embargo,

179
UU183

preferiblemente el fragmento inmunogénico carece del dominio de señal/anclaje en su extremo N-terminal.

Preferiblemente, la proteína heteroquimérica está unida mediante un aminoácido de la parte C-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV a un aminoácido de la parte N-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína G de RSV, la proteína HN de PIV1, PIV2, PIV3, MuV o la proteína H de MV.

Convenientemente, la proteína heteroquimérica comienza en su extremo N-terminal con una secuencia señal de la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV. Convenientemente, ésta formará parte del correspondiente fragmento inmunogénico de la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV cuando este fragmento se una mediante su extremo C-terminal al extremo N-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína G de RSV, la proteína HN de PIV1, PIV2, PIV3, MuV o la proteína H de MV.

También pueden emplearse secuencias señal alternativas. Por ejemplo, la proteína heteroquimérica comienza convenientemente en su extremo N-terminal con una secuencia señal del activador de plasminógeno de tejidos (TPA).

Para aumentar el nivel de expresión, la proteína heteroquimérica puede comprender además una secuencia líder de ubiquitina que convenientemente se coloca después de

cualquier secuencia señal como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, la secuencia líder de ubiquitina se une al extremo C-terminal de la secuencia señal de TPA.

Preferiblemente, la secuencia líder de ubiquitina procede de levaduras, por ejemplo, como se describe en Ecker y col., J Biological. Chemistry, 1988, 264 (13), 7715-7719.

Convenientemente, se coloca un sitio de escisión entre el extremo C-terminal de la secuencia de ubiquitina y el extremo N-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV.

Para facilitar la purificación cromatográfica, la proteína heteroquimérica comprende convenientemente una cola de polihistidina, por ejemplo, como se describe en Hochuli y col., BIO/TECHNOLOGY, 1988, 1321-1325. La cola de polihistidina preferiblemente comprende de 2 a 6 restos de histidina adyacentes que están unidos convenientemente al extremo C-terminal de la proteína heteroquimérica. Preferiblemente, se pone un sitio de escisión entre la cola de polihistidina y el extremo C-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína G de RSV, la proteína HN de PIV1, PIV2, PIV3, MuV o la proteína H de MV.

El sitio de escisión para la secuencia de ubiquitina y/o la cola de polihistidina puede ser químico o enzimático

131

UU185

y preferiblemente es un sitio de escisión de enteroquinasa, por ejemplo, como se describe en LaVallie y col., BIO-TECHNOLOGY, 1993, 187-193.

Después de la expresión y purificación, el tratamiento con una enteroquinasa escindirá cualquier secuencia de ubiquitina y/o polihistidina liberando la proteína heteroquimérica deseada.

Las proteínas heteroquiméricas particulares de esta invención incluyen: la proteína F de RSV que carece de su dominio de membrana unida por su extremo C-terminal a la proteína HN de MuV que carece de su dominio de señal/anclaje, denominada aquí:

$Fs^{+}a^{-}RSV$ x $HNs^{-}a^{-}MuV$, así como

$Fs^{+}a^{-}PIV3$ x $HNs^{-}a^{-}MuV$;

$Fs^{+}a^{-}MuV$ x $Gs^{-}a^{-}RSV$; y

$Fs^{+}a^{-}MuV$ x $HNs^{-}a^{-}PIV3$, y

derivados inmunogénicos de las mismas.

La presente invención también proporciona proteínas heteroquiméricas particulares que incluyen:

$Fs^{+}a^{-}MuV$ x $Hs^{-}aMV$; o

$Fs^{+}a^{-}RSV$ x $HNs^{-}a^{-}PIV1$; o

$Fs^{+}a^{-}RSV$ x $HNs^{-}a^{-}PIV2$, y

derivados inmunogénicos de las mismas.

La presente invención también proporciona proteínas heteroquiméricas que comprenden proteínas de RSV y PIV3 no

182

descritas específicamente en el documento WO 9314207, que pueden expresarse ventajosamente en células CHO.

UU186

Éstas son:

$Fs^{+}a^{-}$ (1-526) RSV x $HNs^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3;

$Fs^{+}a^{-}$ (1-492) PIV3 x $Gs^{-}a^{-}$ (69-298) RSV;

$Fs^{+}a^{-}$ (1-526) RSV x $HNs^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3 bis;

$Fs^{+}a^{-}$ (1-526) RSV x $HNs^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3 ent his, y

sTPA (1-21) UB (1-74) ent $Fs^{-}a^{-}$ (24-526) x HN $s^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3, y derivados inmunogénicos de las mismas.

Los significados de s, a, (+) y (-) son como sigue:

"s" dominio simple

"a" dominio amplio

"(+)" dominio presente

"(-)" dominio ausente

Las proteínas heteroquiméricas de la presente invención son inmunogénicas. El término derivado inmunogénico, según se usa aquí, incluye cualquier molécula que es un polipéptido heteroquimérico que es inmunológicamente reactivo con anticuerpos producidos contra la proteína heteroquimérica de la presente invención o partes de la misma o con anticuerpos que reconocen la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV, la proteína G de RSV, la proteína HN de PIN1, PIV2, PIV3, MuV, la proteína H de MV, el virus RSV, el virus PIV1, el virus PIV2, el virus PIV3, el virus MV o el virus MuV, o que cuando se administra a los seres humanos, produce anticuerpos que reconocen la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV, la proteína G de RSV, la proteína HN de PIV1, PIV2, PIV3, MuV, la proteína H de MV, el virus RSV, el virus PIV1, el virus PIV2, el virus PIV3, el virus MV o

el virus MuV. En particular, pueden usarse derivados inmunogénicos que son ligeramente más largos o más cortos que las proteínas heteroquiméricas de la presente invención. Por ejemplo, tales derivados pueden prepararse por sustitución, adición o redisposición de aminoácidos o por modificaciones químicas de los mismos incluyendo el acoplamiento, o para permitir el acoplamiento de las proteínas heteroquiméricas a otras proteínas de soporte tales como el toxoide tetánico o el antígeno superficial de la Hepatitis B. Todas tales sustituciones y modificaciones generalmente son bien conocidas para los especialista en la técnica de la química de los péptidos.

Los fragmentos inmunogénicos de las proteínas heteroquiméricas que pueden ser útiles en la preparación de vacunas, pueden prepararse mediante la expresión de los fragmentos génicos apropiados o por síntesis de péptidos, por ejemplo, usando la síntesis de Merrifield (The Peptides, Vol 2., Academic Press, New York, p3).

En otro aspecto de la invención, se proporciona un ADN recombinante que codifica la proteína heteroquimérica de la invención. El ADN recombinante de la invención puede formar parte de un vector, por ejemplo, un plásmido, especialmente un plásmido de expresión a partir del cual puede expresarse la proteína heteroquimérica. Tales vectores también forman parte de la invención, así como las células hospedadoras en

las que se han introducido los vectores.

Para construir el ADN que codifica una proteína heteroquimérica de acuerdo con la invención, el ADNc que contiene las secuencias codificantes de las proteínas de fusión y unión de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV y, opcionalmente, de los sitios de escisión de ubiquitina, polihistidina y enteroquinasa, pueden manipularse usando técnicas convencionales [véase, por ejemplo, Maniatis T. y col., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y. (1982)] como se describe adicionalmente a continuación.

En otro aspecto de la invención, se describe un procedimiento para aumentar la expresión de proteínas en células de mamífero mediante la optimización del uso de codones de los ácidos nucleicos transfectados en las mismas. La optimización del uso de codones implica el reemplazo de al menos un codón no preferido o menos preferido en un gen natural que codifica una proteína heteroquimérica por un codón preferido que codifica el mismo aminoácido. Los genes con alta expresión en mamíferos tienen una C o G en su posición degenerativa (tercera base del codón), mientras que los codones prevalentes en RSV o PIV3 tienen A o T. Al menos un codón y, más preferiblemente, todos los codones de la proteína de RSV o PIV3 pueden cambiarse para ajustarse mejor al uso humano,

es decir, al (a los) que sea(n) más prevalente(s) como se muestra a continuación.

Ala: GCC	Cys: TGC	His: CAC	Met: ATG	Thr: ACC
Arg: CGC AGG CGG	Gln: CAG	Ile: ATC	Phe: TTC	Trp: TGG
Asn: AAC	Glu: GAG	Leu: CTG	Pro: CCC	Tyr: TAC
Asp: GAC	Gly: GGC	Lys: AAG	Ser: AGC TCC	Val: GTG

Cada aminoácido codificado por uno de estos codones se considera humanizado. La relación entre el número de codones humanizados frente al número total de aminoácidos, proporciona el porcentaje de humanización que se muestra a continuación.

1) $F_{RSV\ (1\text{-}526)\ original}$ 140/526 = 27%

2) $F_{RSV\ (1\text{-}423)\ humanizado}$ + (424-526)original 403/526 = 77%

3) $F_{RSV\ (1\text{-}526)\ humanizado}$ 489/526 = 93%

4) $F_{RSV\ (1\text{-}526)\ original}$ + $HN_{PIV3\ (70\text{-}572)\ original}$ 258/1029 = 25%

5) $F_{RSV\ (1\text{-}526)\ humanizado}$ + $HN_{PIV3\ (70\text{-}572)\ original}$ 528/1029 = 51%

6) $F_{RSV\ (1\text{-}526)\ humanizado}$ + $HN_{PIV3\ (70\text{-}572)\ humanizado}$ 96%

La invención también proporciona ADN que codifica una proteína heteroquimérica o un derivado inmunogénico de la misma, donde el uso de codones de uno o más ácidos nucleicos se ha optimizado sustancialmente y un procedimiento para expresar dicho ADN en una célula CHO o

de insecto.

Existen varios informes que han descrito una mejora sustancial de la expresión de proteínas en células de mamífero después de la reobtención por ingeniería genética de la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína heteróloga para ajustarla al uso de codones encontrado en genes humanos con alta expresión (Haas J., Park E-C. y Seed B., Codon usage limitation in the expression of HiV-1-envelope glycoprotein, Current Biology, 1996, 6, n° 3, 315-325; Kim C.H., Oh Y. y Lee T.H., Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells, Gene 199, 1997, 293-301; Zolotukhin S., Potter M. Hauswirth W.W. Gay J. and Muzyczka N. A Humanized green fluorescent protein cDNA adapted for high level expression in mammalian cells. J. of Virology, July 1996, 70, n° 7, 4646-4654).

Los vectores que comprenden tales ADN, los hospedadores transformados con los mismos y las propias proteínas híbridas o truncadas expresadas como se describe más adelante, forman parte de la invención.

Para la expresión de las proteínas de la invención, pueden construirse plásmidos que son adecuados para la trasferencia en virus de vaccinia o para la transfección en células CHO, células de insecto o células Vero. A continuación se describen los vectores de expresión

adecuados. Preferiblemente, las proteínas de la presente invención se expresan en células CHO o de insectos.

Para la expresión en vaccinia, puede usarse un plásmido de transferencia de vaccinia, tal como pULB 5213, que es un derivado de pSC11 (Chakrabati y col. Molecular and Cellular Biology 5, 3403-3409, 1985). En un aspecto, la proteína puede expresarse bajo el control del promotor $P_{7,5}$ de vaccinia.

Para la expresión en células CHO-K1, puede usarse convenientemente un vector de la glutamina sintetasa (GS) tal como pEE14, de forma que la proteína se exprese bajo el control del promotor temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (hCMV-MIE). Alternativamente, puede usarse convenientemente un vector que permita la expresión del módulo codificante como un transcrito policistrónico con el gen de selección *neo*. En un aspecto preferido, el módulo codificante está bajo el control del promotor de la Repetición Terminal Larga del Sarcoma de Rous (Rous Sarcoma Long Terminal Repeat (LTR)).

Preferiblemente, el plásmido para la expresión en células CHO-K1 lleva un cassette de expresión GS adecuado para la amplificación génica usando metionina sulfoximina (MSX). Alternativamente, el plásmido para la expresión en células CHO-K1 lleva un cassette de expresión DHFR adecuado para la amplificación génica usando metotrexato (MTX).

Preferiblemente, la expresión de la proteína heteroquimérica de la presente invención se realiza en presencia de butirato sódico y/o dimetil sulfóxido (DMSO), lo cual puede aumentar la expresión génica.

Para la expresión en células de insecto, puede usarse un vector lanzadera tal como pAcUW51 o pAcGP67. En un aspecto, la proteína puede expresarse bajo el control del promotor p10 de baculovirus o el promotor de la polihedrina.

El sistema de expresión también puede ser un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria. El gen de interés puede insertarse en el genoma de un virus o una bacteria viva recombinantes. La inoculación y la infección *in vivo* con este vector vivo conducirá a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunes. Los virus y bacterias usados para este fin son, por ejemplo: poxvirus (por ejemplo, vaccinia, epitelioma contagioso, canarypox), alfavirus (virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina de Venezuela), adenovirus, virus asociados con adenovirus, picornavirus (poliovirus, rinovirus), virus de herpes (virus de varicela zoster, etc), Listeria, Salmonella, Shigella, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o estar atenuados de diversas formas para obtener vacunas vivas. Tales vacunas

189
GU193

vivas también forman parte de la invención.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una proteína heteroquimérica o un derivado inmunogénico de la misma de acuerdo con la invención, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, una proteína de acuerdo con la invención para uso en la vacunación de un mamífero y el uso de una proteína de acuerdo con la invención en la preparación de una vacuna.

Opcional y ventajosamente, la vacuna de la presente invención se combina con otros inmunógenos para producir una vacuna polivalente. En una realización preferida, la proteína heteroquimérica se combina con otros subcomponentes de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MuV o MV, por ejemplo, las proteínas individuales F, G, HN o H o con proteínas homoquiméricas tales como RSV FxG, PIV3 FxHN o MuV FxHN.

En un aspecto particular, la invención además proporciona una composición de vacuna que comprende una proteína de acuerdo con la invención junto con un vehículo o adyuvante adecuado.

En New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A., 1978, se describe en general la preparación de una vacuna. La encapsulación dentro de

liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, en la Patente de Estados Unidos 4.235.877.

En la vacuna de la presente invención puede usarse directamente una solución acuosa de la(s) proteína(s). Alternativamente, la proteína, con o sin liofilización previa, puede mezclarse, absorberse o adsorberse con cualquiera de los diversos adyuvantes conocidos. Tales adyuvantes incluyen, pero sin limitación, hidróxido de aluminio, muramil dipéptido y saponinas tales como Quil A. Son adyuvantes particularmente preferidos el MPL (moncfosforil lípido A) y el 3D-MPL (monofosforil lípido A 3-desacilado) [Patente de Estados Unidos 4.912.094], opcionalmente formulado con hidróxido de aluminio (documento EP 0 689 454) o emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210). Otro adyuvante preferido se conoce como QS21, que puede obtenerse por el procedimiento descrito en la patente de Estados Unidos 5.057.540. El uso de 3D-MPL se describe por Ribi y col., en Microbiology (1986) Levie y col (eds) Amer. Soc. Microbiol. Wash. D.C., 9-13. El uso de Quil A se describe por Dalsgaard y col., (1977), Acta Vet Scand, *18*, 349. El uso de 3D-MPL y QS21 combinados se describe en el documento WO 94/00153 (SmithKline Beechman Biologicals s.a). QS21 puede formularse ventajosamente con liposomas que contienen colesterol, donde 3D-MPL está presente en solución o

incorporado en la membrana, como se describe en el documento WO 96/33739.

Como alternativa ejemplar adicional, una proteína heteroquimérica de la invención o un fragmento inmunogénico de la misma puede encapsularse dentro de micropartículas tales como liposomas o asociarse con emulsiones de aceite en agua. La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton en la patente de Estados Unidos 4.235.877. En otra alternativa ejemplar, una proteína heteroquimérica de acuerdo con la invención o un fragmento inmunogénico de la misma puede conjugarse con una macromolécula inmunoestimuladora tal como *Bordetella* inactivada o un toxoide tetánico. La conjugación de proteínas con macromoléculas se describe, por ejemplo, por Likhite en la patente No. 4.372.945 y por Armor y col., en la patente de Estados Unidos No. 4.474.757.

La cantidad de la proteína de la presente invención presente en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se emplee y de si la vacuna lleva adyuvante o no. Generalmente, es de esperar que cada dosis comprenda de 1 a 1000 μg de proteína, preferiblemente de 1 a 200 μg. Una cantidad óptima para una vacuna particular puede

averiguarse por estudios convencionales que implican la observación de concentraciones de anticuerpos y de otras respuestas en los sujetos.

Los siguientes ejemplos y las figuras adjuntas (explicadas más adelante) ilustran la invención.

En las Figuras:

La Figura 34A muestra el impacto de la humanización sobre el nivel de expresión de FrHNp, donde:

FhHNE10 = el producto expresado por el clon E10 transfectado con pEE14FhHN;

FhHNE7 = el producto expresado por el clon E7 transfectado con pEE14FhHN;

FHNbis = el producto expresado por el clon transfectado con pEE14FHN;

+ but = se ha añadido nabutirato 2 mM al medio celular, 3 días antes de la recolección;

pEE14 = control negativo;

Fdroso = Fa- purificado (derivado de drosophila); la proteína patrón está en el ensayo ELISA, donde 1 μl de patrón corresponde a 1 ng de producto.

La Figura 34B muestra el impacto de humanización sobre el nivel de expresión de $F_{RSV}HN_{piV3}$, donde el nivel de expresión se determinó por ELISA. Fdroso = Fa- purificado (derivado de drosophila), que es la proteína patrón en este ensayo ELISA, 1 μl de patrón corresponde a 1 ng de producto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Para vacunar con un solo inmunógeno, se construyeron moléculas de ADN heteroquiméricas combinando dominios extracelulares de la proteína F y de la proteína de unión para cada virus. Ya se han descrito construcciones de ADN para PIV3 y MuV en los documentos WO9306218 y WO9425600, respectivamente. La molécula de ADN que combina los dominios extracelulares de las proteínas F y G de RSV se construyó como se describe más adelante.

En primer lugar, las piezas de ADN se insertaron en el vector de expresión de mamífero basándose en el replicón del virus del bosque de Semliki (pSFV1). Este sistema de expresión no conduce a una línea de células de mamífero de expresión estable, pero sin embargo proporciona una indicación de si la proteína quimérica se expresa o no y de si el producto se secreta eficazmente en el medio de cultivo, lo cual es ventajoso para el procedimiento de purificación.

Se prefiere una expresión estable en el medio de cultivo de líneas de células de mamífero para obtener una buena calidad y cantidad de glicoproteínas de paramixovirus. Todos los módulos quiméricos se han insertado en el vector lanzadera, el pEE14, que se integra en el genoma de células de mamífero tales como CHO-K1. Se

obtuvo un nivel de expresión bastante bueno con la proteína recombinante homoquimérica RSV FxG, sin embargo, se obtuvo una expresión despreciable para la proteína homoquimérica recombinante FxHN de PIV3 o MuV. La expresión de las proteínas heteroquiméricas se obtuvo a partir de células CHO.

Así pues, mediante la construcción de moléculas de ADN heteroquiméricas mediante la combinación de los dominios extracelulares de la proteína F de un virus unidos al dominio extracelular de la proteína HN o G de otro virus y la inserción de los mismos en el vector pEE14 para la expresión en CHO, ha sido posible elevar el nivel de expresión de estas proteínas. Estas proteínas pueden usarse para conseguir protección contra al menos dos virus del grupo de los paramixovirus con un solo inmunógeno.

Algunas de las moléculas quiméricas se han insertado en vectores lanzadera, pAcUW51 y pACGP67, que se integran en el genoma de células bacterianas y de lepidópteros. Se obtuvo una expresión sorprendentemente buena de proteínas heteroquiméricas en células de insectos.

Construcción del vector

Construcciones preliminares

a) Plásmido pNIV2819

A partir del plásmido pNIV2801, un clon de ADNc que codifica, entre otras, la proteína F de RSV (de tipo RSS-2;

recibida del Dr. Pringle, UK), se reconstruyó un módulo de ADNc que codificaba para la proteína F que carecía de la secuencia de anclaje a la membrana.

El plásmido pNIV2801 se digirió con *Pst*I para recuperar una pieza de ADN de 1416 pb que codificaba los restos aminoácidos 18 a 489 de la proteína F. Se usaron oligonucleótidos sintéticos, que especificaban respectivamente las secuencias para los aminoácidos 1 a 17 y 490 a 526, para producir los correspondientes fragmentos de ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa realizada con el ADN de pNIV2801 como molde. Los cebadores se diseñaron para generar también sitios de restricción flanqueantes únicos útiles para las posteriores etapas de clonación. El módulo de codificación se montó, por unión, a partir de las tres piezas de ADN descritas anteriormente y se introdujo en el vector de clonación convencional pUC19, para crear el plásmido pNIV2819. El plásmido codifica la proteína F de RSV, que lleva su secuencia señal pero carece de su secuencia de anclaje (figura 1).

b) Plásmido pNIV 2820

El módulo de ADNc que codifica la proteína F de longitud completa de RSV se construyó como se indica a continuación. Usando dos oligonucleótidos sintéticos, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con el ADN de pNIV2801 como molde para generar un fragmento de ADN de

273 pb que incluía la secuencia codificante para el aa 490 al aa 574 de la proteína F, el codón stop y los sitios de restricción únicos para las posteriores etapas de clonación. Este fragmento se digirió con *Nsi*I y *Eco*RI y sustituyó a la pieza de ADN *Nsi*I-*Eco*RI presente en el módulo codificante del pNIV2819 (figura 2). El plásmido resultante, pNIV2820, por lo tanto codifica la proteína F de RSV que lleva tanto la secuencia señal como la secuencia de anclaje a la membrana.

c) Plásmido pNIV2841

En esta construcción, el ADN que codifica para los aa 165 a 176 de la proteína G de RSV se fusiona con el ADN que codifica la proteína $Fs^{+}a^{-}$ de RSV. Esta parte de la proteína G se conserva entre dos subgrupos de RSV.

El material de partida, pNIV2819, se digirió por *Nco*I y *Sma*I produciendo un fragmento de 1601 pb. Este fragmento se subclonó en los sitios *Nco*I y *Msc*I de pNIV103 (un derivado de pULB1221, véase la Solicitud de Patente europea No. 186643) conduciendo a pNIV2844. Esta subclonación permitió poner el sitio de iniciación de la traducción de la proteína F en un contexto más favorable de acuerdo con el modelo propuesto por Kozak (Kozak M, Nature 308, 241-246, 1984).

Se recuperó un fragmento de 1605 pb a partir de pNIV2844 por digestión con *Kpn*I y *Sal*I y se introdujo por

unión en pUC19 digerido con *Kpn*I y *Sal*I, creando pNIV2840.

Se hibridaron dos oligonucleótidos sintéticos complementarios que especificaban la secuencia para los aminoácidos 175 a 176 de la proteína G seguidos por un codón stop y flanqueados por sitios *Nsi*I, *Bam*Hi, *Eco*RI y *Hind*II. El fragmento resultante de 55 pb se clonó en el pNIV2840 digerido con *Nsi*I y *Hind*III, reemplazando de esta forma una secuencia de ADN de 142 pb que codificaba los aminoácidos 491 a 526 de la proteína F. Por lo tanto, el plásmido recombinante resultante, pNIV2841, contiene la secuencia codificante para los aminoácidos 1 a 490 de la proteína F, seguido por los aminoácidos 165 a 176 de la proteína G (figura 3).

Construcción del vector

I) Para transferencia en el vector pSFV1

a) La proteína de fusión de RSV que carece del dominio de anclaje en la membrana fusionada con la hemaglutinina-neuraminidasa de MuV que carece del dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{MuV} (60-582).

El plásmido pNIV2875, un derivado de pNIV2820 que lleva el ADN que codifica para la proteína F de RSV en el que el sitio de restricción *Spe*I se ha eliminado por mutagénesis de localización dirigida en el vector pUC19, se ha digerido con *Hind*III y *Bsp*HI, y se ha aislado un fragmento de 1618 pb. El plásmido pNIV3229, un derivado de

pNIV3215 cuya construcción ya se ha descrito en el documento WO9425600 y que lleva el ADN que codifica para la proteína HN de MuV en el vector pUC19, se ha digerido con *Bbs*1 y *Bam*HI; y se ha aislado un fragmento de 1580 pb. Los dos fragmentos se unieron entre sí por dos oligonucleótidos sintéticos complementarios *Bsp*HI-*Bbs*1 (Fig 4A) restaurando la secuencia codificante de la molécula quimérica y se insertaron en el sitio *Bam*HI-*Hind*III del vector pUC19 conduciendo a pNIV4102. (Fig 4B) Después de la secuenciación de las regiones de unión, el cassette quimérico se recuperó de pNIV4102 por digestión con *Bam*HI y se insertó en el sitio *Bam*HI del vector pSFV1 (Liljeström, P. y Garoff, H. (1991) Bio/Technology 9, 1356). El plásmido resultante, pNIV4104, contiene en el vector pSFV1 la secuencia que codifica para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína F de RSV seguido por los aminoácidos 60 a 582 de la proteína HN de MuV (Fig 4C).

b) La proteína de fusión de RSV que carece del dominio de anclaje a la membrana fusionada con la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece del dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{PIV3} (70-572).

El plásmido pIBI-HN, un clon de ADNc que contiene la secuencia codificante completa de la proteína HN de PIV3 así como su secuencia no codificante 3' (recibido de Dr. K. Dimock, University of Ottawa, Canadá) se ha digerido con

*Ase*I y *Bam*HI y se ha aislado un fragmento de 1468 pb. El plásmido pNIV2875 (véase supra), que lleva el ADN que codifica la proteína F de RSV, en el que el único sitio *Spe*I se ha eliminado por mutagénesis de localización dirigida, insertado en el vector pUC19, se ha digerido por *Bam*HI y *Bsp*HI, y se ha aislado un fragmento de 1588 pb. Los dos fragmentos se unieron entre sí por dos oligonucleótidos sintéticos complementarios *Bsp*HI-*Ase*I (Fig 5A) y se insertaron en el sitio *Bam*HI del vector pUC19 conduciendo a pNIV4105 o a pNIV4109 (Fig 5B), dependiendo de la orientación del módulo quimérico en el vector. Después de la secuenciación de la región de unión, el cassette quimérico se recuperó mediante una digestión con *Bam*HI de pNIV4109 y se insertó en el sitio *Bam*HI del vector pSFV1. El plásmido resultante, pNIV4110, contiene, insertado en el vector pSFV1, la secuencia codificante de los aminoácidos 1 a 526 de la proteína F de RSV seguidos por los aminoácidos 70 a 572 de la proteína HN de PIV3 (Fig 5C).

c) La proteína de fusión de PIV3 que carece del dominio de anclaje a la membrana fusionada con la proteína de unión de RSV que carece del dominio de señal/anclaje, F_{PIV3} (1-492) G_{RSV} (69-298)

El plásmido pNIV3310, descrito en el documento WO9306218 que lleva el ADN que codifica para los aminoácidos 1 a 484 de la proteína F de PIV3 seguidos por

los aminoácidos 87 a 572 de la proteína HN de PIV3 en el vector pIBI, se digirió con *Eco*RI y *Bgl*II y se aisló un fragmento de 1435 pb. El plásmido pNIV2850, que lleva la proteína G de RSV en el vector pUC19, se ha digerido por *Mae*III y *Hind*III, y se ha aislado un fragmento de 694 pb. Después, los dos fragmentos se unieron entre sí mediante el uso de dos adaptadores sintéticos complementarios *Bgl*II-*Mae*III (Fig 6A) y se insertaron en los sitios *Eco*RI-*Hind*III del vector PUC19 conduciendo a pNIV4103 (Fig 6B). Después, el módulo quimérico se recuperó del vector pUC19 por una digestión *Bam*HI-*Hind*III. Después del tratamiento de los extremos salientes con la polimerasa de Klenow, el cassette quimérico se ha insertado en el sitio *Sma*I del vector pSFV1. Por lo tanto, el plásmido pNIV4106 resultante contiene la secuencia codificante para los aminoácidos 1 a 492 de la proteína F de PIV3 seguidos por los aminoácidos 69 a 298 de la proteína G de RSV insertada en el vector pSFV1 (Fig 6C).

d) La proteína de fusión de PIV3 que carece del dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de MuV que carece del dominio de señal-anclaje, F_{PIV3} (1-493) HN_{MuV} (60-582).

El plásmido pNIV3310 (véase supra, FHN_{PIV3} en pIBI) se digirió por *Eco*RI y *Bgl*II y se aisló un fragmento de 1435 pb. El plásmido pNIV3229 (véase supra, HN_{MuV} en pUC19) se

digirió por *Bbs*I y *Hind*III y se aisló un fragmento de 1610 pb. Los dos fragmentos se unieron entre sí mediante la adición de dos adaptadores sintéticos complementarios que especificaban un extremo *Bgl*II y un extremo *Bbs*I (Fig 7A) en el vector pUC19, conduciendo a pNIV4117 (Fig 7B). Después de la secuenciación de la región de unión, el cassette quimérico se recuperó del vector pUC19 por digestión con *Bam*HI y se insertó en el sitio *Bam*HI del vector pSFV1. El plásmido resultante pNIV4118 codifica, clonado en el vector pSFV1, la secuencia de ADN que especifica los aminoácidos 1 a 493 de la proteína de fusión de PIV3 unidos a los aminoácidos 60 a 582 de la proteína HN de MuV (Fig 7C)

e) La proteína de fusión de MuV que carece de su dominio de anclaje a la membrana unida a la proteína de unión de RSV que carece de su dominio de señal-anclaje, F_{MuV} (1-482) G_{RSV} (69-298).

El plásmido pNIV3221, descrito en el documento WO9425600 que lleva la secuencia codificante de los aminoácidos 1 a 462 de la proteína de fusión de MuV dentro del vector pUC19, se ha digerido con *Eco*RI y *Bsr*FI y se ha purificado un fragmento de 771 pb. El plásmido pNIV3221 también se ha digerido con *Bsr*FI y *Pst*I y se ha aislado un fragmento de 628 pb. El plásmido pNIV2850 (véase supra, G_{RSV} en el pUC19) se ha digerido con *Mae*III y *Hind*III y se ha

aislado un fragmento de 694 pb. Los tres fragmentos se unieron entre sí; la unión F_{MuV}/G_{RSV} se creó mediante la adición a la reacción de unión de dos oligonucleótidos sintéticos complementarios que especificaban sitios *Pst*I y *Mae*III (Fig 8A) y se insertaron en los sitios *Eco*RI-*Hind*III del vector pBluescript, conduciendo a pNIV4113 (Fig 8B). El cassette quimérico se recuperó de pNIV4113 por digestión con *Asp718*I y, después del tratamiento de los extremos salientes con la polimerasa de Klenow, se insertó en el sitio *Sma*I del vector pSFV1. El plásmido resultante, pNIV4114 contiene en el vector pSFV1 la secuencia que especifica los aminoácidos 1 a 482 de la proteína F de MuV unida a los aminoácidos 69 a 298 de la proteína G de RSV (Fig 8C).

f) La proteína de fusión de MuV que carece de su dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece de su dominio de señal-anclaje, F_{MuV} (1-482) HN_{PIV3} (54-572).

El plásmido pNIV4113 (véase supra, F_{MuV} x G_{RSV} en pBluescript) se digirió con *Bsa*I y *Bam*HI y se aisló un fragmento de 1469 pb. El plásmido pNIV3308, descrito en el documento WO9306218 y que lleva la secuencia de ADN que especifica los aminoácidos 1 a 31, seguidos por los aminoácidos 54 a 572 de la proteína HN de PIV3 en el vector pIBI, se digirió con *ECo*RI y *Bam*HI y se aisló un fragmento

de 1569 pb. Los dos fragmentos se unieron entre sí por dos adaptadores sintéticos complementarios que especificaban sitios *Bsa*I y *Eco*RI (Fig 9A) en el sitio *Bam*HI de pBluescript, conduciendo a pNIV4115 (Fig 9B). El módulo quimérico se recuperó de pNIV4115 por una digestión con *Bam*HI y se insertó en el sitio *Bam*HI del vector pSFV1. El plásmido resultante, pNIV4116, codifica, en el vector pSFV1, la secuencia que especifica los aminoácidos 1-482 de la proteína F de MuV fusionados a los aminoácidos 54 a 572 de la proteína HN de PIV3 (Fig 9C).

g) La proteína de fusión de RSV que carece de su dominio de anclaje a la membrana unida a la proteína de unión de RSV que carece de su dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) G_{RSV} (69-298).

El plásmido pNIV2857 (Fig 16A), un derivado de pNIV2841 y que contiene la secuencia de ADN que codifica para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína de fusión de RSV unidos a los aminoácidos 69 a 298 de la proteína de unión de RSV, se ha digerido por *Asp718I* e *Hind*III y se ha aislado un fragmento de 2180 pb. Después de tratar las extremidades salientes con polimerasa de Klenow, este fragmento se ha insertado en el sitio *Sma*I del vector pSFV1. El plásmido resultante, pNIV2870, contiene en el vector pSFV1 la secuencia de ADN que codifica para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína de fusión de RSV unidos

a los aminoácidos 69 a 298 de la proteína de unión de RSV (Fig 16B).

II) Para la transfección en células CHO

a) La proteína de fusión de RSV que carece del dominio de anclaje a la membrana fusionada con la hemaglutinina-neuraminidasa de MuV que carece del dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{MuV} (60-582).

El plásmido pNIV4102 (Fig 10A, véase supra, F_{RSV} x HN_{MuV} en el vector pUC19) se ha digerido con *Bam*HI y, después del tratamiento de los extremos salientes con la polimerasa de Klenow, el módulo quimérico se ha insertado en el sitio *Sma*I del vector de la glutamina sintetasa (GS), pEE14 (Cockett y col, 1990, Bio/Technology 8, 662-667). El plásmido resultante pEE14 Fs^+a^- RSV x HN s^-a^- MuV contiene secuencias que codifican para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína F de RSV fusionada a los aminoácidos 60 a 582 de la proteína HN de MuV bajo el control del promotor temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (hCMV-MIE) (Fig 10B).

b) La proteína de fusión de RSV que carece de su dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece de su dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{PIV3} (70-572).

Se digirieron los plásmidos pNIV4105 y pNIV4109 (Fig 11A y B, véase supra, F_{RSV} x HN_{PIV3} en el vector pUC19) con

*Eco*RI y *Xho*I y se aislaron un fragmento de 2032 pb así como un fragmento de 1064 pb. Los dos fragmentos se insertaron conjuntamente en el sitio *Eco*RI de pEE14. El plásmido resultante pEE14 Fs^+a^- RSV x HNs^-a^- PIV3 contiene secuencias que codifican para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína F de RSV fusionados a los aminoácidos 70 a 572 de la proteína HN de PIV3 bajo el control del promotor de hCMV (Fig 11C).

c) La proteína de fusión de PIV3 que carece de la región de anclaje a la membrana unida a la proteína de unión de RSV que carece del dominio de señal-anclaje, F_{PIV3} (1-492) G_{RSV} (69-298).

El plásmido pNIV4103 (Fig 12A, véase supra, F_{PIV3} x G_{RSV} en el vector pUC19) se digirió con *Hind*III y se aisló un fragmento de 2180 pb. Después del tratamiento de las extremidades salientes con la polimerasa de Klenow, el módulo quimérico se insertó en el sitio *Sma*I del vector pEE14. El plásmido resultante, pEE14 Fs^+a^- PIV3 x Gs^-a^- RSV, contiene, bajo el control del promotor de hCMV, la secuencia que codifica los aminoácidos 1 a 492 de la proteína F de PIV3 seguidos por los aminoácidos 69 a 298 de la proteína G de RSV (Fig 12B).

d) La Proteína de fusión de PIV3 que carece del dominio de anclaje a la membrana fusionada a la hemaglutinina-neuraminidasa de MuV que carece del dominio de señal-

anclaje, F_{PIV3} (1-493) HN_{MuV} (60-582).

El plásmido pNIV4117 (Fig 13A, véase supra, $F_{PIV3}HN_{MuV}$ en el vector pUC19) se digirió con *Hind*III, se aisló un fragmento de 3119 pb y se insertó en el sitio *Hind*III del vector pEE14. El plásmido resultante, pEE14 Fs^+a^- PIV3 x HNs^-a^- Muv, contiene bajo el control del promotor de hCMV una secuencia que codifica los aminoácidos 1 a 493 de la proteína de fusión de PIV3 fusionados a los aminoácidos 60 a 582 de la proteína HN de MuV (Fig 13B).

e) La proteína de fusión de MuV que carece de su dominio de anclaje a la membrana fusionada con la proteína de unión de RSV que carece de su dominio de señal-anclaje, F_{MuV} (1-482) G_{RSV} (69-298)

El plásmido pNIV4113 (Fig 14A, véase supra, $F_{MuV}G_{RSV}$ en el vector pBluescript) se ha digerido con *Asp718*I, y los extremos salientes se han tratado con la polimerasa de Klenow. Se ha aislado un fragmento de 2200 pb y se ha insertado en el sitio *Sma*I de pEE14. El plásmido resultante, pEE14 Fs^+a^- MuV x Gs^-a^- RSV, tiene, bajo el control del promotor de hCMV, la secuencia que codifica los aminoácidos 1 a 482 de la proteína F de MuV seguidos por los aminoácidos 69 a 298 de la proteína G de RSV (Fig 14 B).

f) La proteína de fusión de MuV que carece de su dominio de anclaje a la membrana fusionada con la hemaglutinina-

neuraminidasa de PIV3 que carece de su dominio de señal-anclaje, F_{MuV} (1-482) HN_{PIV3} (54-572).

El plásmido pNIV4115 (Fig 15A, véase supra, F_{MuV} x HN_{PIV3} en el vector pBluescript) se ha digerido con *Eco*RI y se ha insertado un fragmento de 3040 pb en el sitio *Eco*RI de pEE14. El plásmido resultante, pEE14 Fs^+a^- MuV x HNs^-a^- PIV3, contiene, cadena abajo de la región promotora de hCMV, una secuencia que codifica para los aminoácidos 1 a 482 de la proteína F de MuV seguidos por los aminoácidos 54 a 572 de la proteína HN de PIV3 (Fig 15B).

g) La proteína de fusión de RSV que carece de su dominio de anclaje a la membrana unida a la proteína de unión de RSV que carece de su dominio de señal-anclaje.

El plásmido pNIV2857 (Fig 17A), un derivado de pNIV2841 y que contiene la secuencia de ADN que codifica para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína de fusión de RSV unida a los aminoácidos 69 a 298 de la proteína de unión de RSV, se ha digerido con *Asp718*I y *Hind*III y se ha aislado un fragmento de 2180 pb. Después de tratar las extremidades salientes con polimerasa de Klenow, este fragmento se ha insertado en el sitio *Sma*I del vector pEE14. El plásmido resultante, pEE14 Fs^+a^- RSV x Gs^-a^- RSV, contiene, bajo el control del promotor de hCMV, la secuencia de ADN que codifica para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína de fusión de RSV unida a los aminoácidos 69

a 298 de la proteína de unión de RSV (Fig 17B).

h) La proteína de fusión de RSV original que carece del dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece del dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{PIV3} (70-572) bis.

El plásmido pNIV2852, un derivado de pNIV2820 que lleva el ADN que codifica la proteína F de RSV, donde el sitio de iniciación de la traducción está en un contexto más favorable de acuerdo con el modelo propuesto por Kozak (Kozak M, Nature 308, 241-246, 1984), se ha digerido con *Bam*HI y *Bsp*HI y se ha aislado un fragmento de 1588 pb.

El plásmido pIBI-HN, un clon de ADNc que contiene la secuencia codificante completa de la proteína HN de PIV3 (recibida de Dr. K. Dimock, University of Ottawa, Canadá) se ha digerido con *Ase*I y *Bam*HI y se ha aislado un fragmento de 1468 pb.

Los dos fragmentos se unieron entre sí por dos adaptadores sintéticos complementarios *Bsp*HI-*Ase*I (Fig 18A) y se insertaron en el sitio *Bam*HI del vector pUC19 conduciendo a pNIV4120 (Fig 18B).

Después de la secuenciación de la región de unión, el cassette quimérico se recuperó por una digestión con *Bam*HI de pNIV4120 y se insertó en el sitio *Bcl*I compatible con *Bam*HI del vector pEE14. El plásmido resultante pEE14 Fs^+a^- RSV x HNs^-a^- PIV3 bis contiene las secuencias que codifican

para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína F de RSV fusionados con los aminoácidos 70 a 572 de la proteína HN de PIV3, bajo el control del promotor de hCMV (Fig 18C).

La construcción difiere de la construcción anterior pEE14 Fs^+a^- RSV x HNs^-a^- PIV3 (II-a) en la región codificante de F. En $F_{RSV}HN_{PIV3}$ **bis**, la secuencia de ácidos nucleicos encontrada en $F_{RSV}HN_{PIV3}$, ATG GAT CTG (estos codones son los que especifican los aa Met1, **Asp2** y Leu3) y ACC AGT (que especifican los aa Thr54 y Ser 55) se reemplaza por la secuencia original de la proteína F de RSV, que es ATG GAG TTG (que especifica los aa Met1, **Glu2** y Leu3) y ACT AGT (que especifica Thr54 y Ser55).

i) La proteína de fusión de RSV original que carece del dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece del dominio de señal-anclaje con, en la parte C-terminal, una cola de polihistidina precedida por el sitio de escisión de la enteroquinasa, F_{RSV} (1-526) HN_{PIV3} (70-572) en his.

El plásmido pIBI-HN, un ADNc que contiene la secuencia codificante de la proteína HN de PIV3 (véase supra) se ha digerido con *Pst*I y *Sph*I. Se ha aislado un fragmento de 4588 pb y se ha unido a adaptadores sintéticos complementarios *Pst*I-*Sph*I (Fig 19A).

Después de la secuenciación de las uniones, así como de los adaptadores sintéticos, el plásmido pNIV3340

resultante se ha digerido con *Xho*I y *Bam*HI y se ha aislado un fragmento de 1121 pb (Fig 19B).

El plásmido pNIV4120 (véase supra) se ha digerido por *Xho*I y *Bam*HI y se ha aislado un fragmento de 2017 pb (Fig 19C).

Los dos fragmentos se unieron entre sí y se insertaron en el sitio *Bcl*I compatible con *Bam*HI del vector pEE14. El plásmido resultante pEE14 FRSVs^{+}a^{-} x HNs^{-}a^{-} en his contiene, bajo el control del promotor de hCMV, secuencias que codifican para los aminoácidos 1 a 526 de la proteína de fusión de RSV fusionada a los aminoácidos 70-572 de la proteína HN de PIV3 fusionada al sitio de escisión de enteroquinasa ({Asp} x 4 Lys), seguido por una cola de polihistidina ({his}x6) y un codón stop (Fig 19D).

j) El dominio de señal del activador de plasminógeno de tejidos fusionado con la ubiquitina de levadura, seguida por el sitio de reconocimiento de escisión de la enteroquinasa y la proteína de fusión original de RSV que carece de sus dominios de señal y de anclaje, unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece del dominio de señal-anclaje, sTPA(1-21) UB(1-74) ent F_{RSV} (24-526) HN_{PIV3} (70-572)bis.

1) El dominio de señal del activador de plasminógeno de tejidos fusionado a la ubiquitina de levadura.

Se aisló un fragmento de 208 pb que correspondía a los

aminoácidos 1 a 76 de la proteína ubiquitina de *Sacharomyces cerevisiae* mediante la digestión de pNIV3475 (un derivado de YEPUBSTUALL, un esqueleto del vector de levadura 2μ que lleva la ubiquitina de lavadura) con *Bam*HI y *Xba*I (Fig 20A).

El plásmido JW4304 (recibido de J. Mullins, University of Washington, U.S.A), que codifica el dominio de señal del activador de plasminógeno de tejidos (sTPA) se digirió con *Nhe*I y *Bam*HI y se aisló un fragmento de 5115 pb. Los dos fragmentos se unieron entre sí usando dos adaptadores sintéticos complementarios *Nhe*I-*Xba*I (Fig 20B). El plásmido resultante pNIV4121 se digirió con *Hind*III y *Bam*HI. Se aisló un fragmento de 330 pb y se insertó en los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector pBluescript. El plásmido pNIV4122 resultante contiene la secuencia de ADN que especifica el dominio de señal del activador de plasminógeno de tejidos, seguido por una alanina y un resto de serina (dos aminoácidos que, como se sabe, producen una buena escisión de la secuencia líder) fusionados a la ubiquitina de levadura (Fig 20C).

2) El dominio señal del activador de plasminógeno de tejidos unido a la ubiquitina de levadura y seguido por el sitio de reconocimiento de escisión de enteroquinasa y los aminoácidos 24 a 55 de la proteína de fusión original de RSV.

El plásmido pNIV4122 (Fig. 21A, véase supra) se digirió con *Afl*II y *Spe*I. Se aisló un fragmento de 3212 pb y se unió a adaptadores sintéticos complementarios *Afl*II-*Spe*I (Fig 21 B). Después se secuenció el módulo entero. El plásmido resultante pNIV4123 codifica el dominio señal del activador de plasminógeno de tejidos unido a los 74 aa N-terminales de la ubiquitina de levadura y seguidos por el sitio de reconocimiento de la enteroquinasa {(Asp)4 Lys} y de los aminoácidos 24 a 55 de la proteína de fusión original de RSV (Fig 21C).

3) El dominio de señal del activador de plasminógeno de tejidos unido a la ubiquitina de levadura seguido por el sitio de reconocimiento de escisión de la enteroquinasa y la proteína de fusión de RSV unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece de sus dominios de membrana.

El plásmido pNIV4123 (Fig 22A, véase supra) se digirió por *Hind*III, se trató por la polimerasa de Klenow y se digirió por *Spe*I. Se ha aislado un fragmento de 408 pb. El plásmido pNIV4120 (Fig 22B, véase supra) se ha digerido con *Xba*I, se ha tratado con la polimerasa de Klenow y se ha digerido con *Spe*I. Se ha aislado un fragmento de 5620 pb.

Los dos fragmentos se han unido entre sí para generar pNIV4124 (Fig 22C).

El módulo codificante entero se recuperó de pNIV4124

por una digestión con *Xba*I y *Eco*RI y se insertó en los sitios *Xba*I y *Eco*RI del vector de expresión pEE14. El plásmido resultante pEE14 sTPA x UBI x EN x Fs⁻a⁻RSV x HNs⁻a⁻PIV3, contiene, bajo el control del promotor de hCMV, la secuencia que codifica para los aa 1-21 del activador de plasminógeno de tejidos seguido por una alanina y un resto de serina, por los 74 aminoácidos N-terminales de la ubiquitina de levadura, por el sitio de reconocimiento de escisión de la enteroquinasa ({Asp}4 Lys), por los aa 24-526 de la proteína de fusión original de RSV y por los aa 70-572 de la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3.

III) Para transfección en Células de Insecto

a) La proteína de fusión de RSV original que carece del dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PIV3 que carece del dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{PiV3} (70-572) bis

El plásmido pNIV4120 (FIG 23A) se digirió con *Bam*HI, se aisló un fragmento de 3114 pb y se insertó en el sitio *Bam*HI del vector de transferencia de baculovirus, pAcUW51 (PharMingen). El plásmido resultante pNIV4132 (Fig. 23B) contiene, bajo el control del promotor de la polihedrina, la secuencia que codifica para los aminoácidos 1-526 de la proteína F de RSV fusionados a los aminoácidos 70-572 de la proteína HN de PiV3.

b) El péptido señal de gp67 de baculovirus fusionado a la

proteína de fusión original de RSV que carece del dominio de señal y del dominio de anclaje a la membrana, unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PiV3 que carece del dominio de señal-anclaje, $sGP67F_{RSV}$ (25-526) HN_{PiV3} (70-572) bis.

El plásmido pNIV4120 (Fig 24A, véase supra) se digirió por *Bam*HI y *Spe*I, se aisló un fragmento de 2939 pb, se unió a dos adaptadores sintéticos complementarios *Bam*HI-*Spe*I y el conjunto se insertó en el sitio *Bam*HI del vector de transferencia de baculovirus, pAcGP67A (PharMingen). El plásmido resultante pNIV4136 (Fig 24) contiene, bajo el control del promotor de la polihedrina, la secuencia que codifica para los aminoácidos 1-38 de la proteína gp37 de baculovirus, seguido por una Alanina y un Aspartato unidos a los aminoácidos 25-526 de la proteína F de RSV fusionada a los aminoácidos 70-572 de la proteína HN de PIV3.

Expresión en células eucariotas

A) Mediante el vector pSFV1

El vector pSFV1 se basa en el replicón del virus del bosque de Semliki (SFV). El ADN de interés se clona en el vector pSFV1 que sirve como molde para la síntesis *in vitro* del ARN recombinante. El ARN se utiliza para transfectar células de mamífero tales como células BHK-21. El ARN recombinante de las células dirige su propia replicación y protección dando como resultado la producción de proteínas heterólogas.

El plásmido pNIV2870 se digirió con *PvuI*; los plásmidos pNIV4106, pNIV4110, pNIV4114, pNIV4116 y pNIV4118 se digirieron con *SpeI* antes de la transcripción del ARN. Después de una extracción con fenol seguida por una precipitación con etanol, se usaron 2 µg de ADN linealizado como molde para la producción de ARN. Se usaron aproximadamente 5 µg de ARN para la transfección, por electroporación, de aproximadamente 8 x 10^6 células BHK-21. Todos los procedimientos experimentales para la producción de ARN y la transfección de células se detallan en Lijestrom y Garoff (Bio/Technology, 1991, 9, 1356).

De 24 a 48 horas después de la electroporación, se han recogido las células y el medio de cultivo gastado para realizar ensayos ELISA y de radioinmunoprecipitación.

a) pNIV4104, $F_{RSV}HN_{MuV}$

Los ELISA se realizaron usando mAb 2072 anti-HN MuV (Örvell, 1984, *J. Immunology 132*, 2622-2629) o 20RG45, un suero de cabra anti-RSV (Fitzgerald, U.S.A) para recubrir las placas de microvaloración, y un suero policlonal de conejo anti-SBL-1 (MuV) o mAb19 anti-F RSV (G. Taylor, Inst. of Animal Health, Compton Lab., U.K.) como anticuerpo de captura.

La radioinmunoprecipitación del producto marcado con ^{35}S-metionina se hizo usando mAb2072 (Örvell) y los productos se resolvieron en SDS-PAGE al 7,5%.

b) pNIV4110, F_{RSV} HN_{PIV3}

Los ELISA se realizaron usando suero de cabra anti-RSV 20RG45 o mAb anti-HN_{PIV3} 4830 (Rydbeck y col., *J. Gen. Virol.* 67, 1531-1542, 1986) para recubrir las placas de microvaloración, y mAb19 anti-F RSV (G. Taylor) o suero de conejo anti-PIV3 (E. Norrby, Stockholm) como anticuerpo de captura.

La radioinmunoprecipitación se realizó usando mAb4830 anti-HN PIV3.

c) pNIV4106, F_{PIV3} G_{RSV}

Los ELISA se realizaron usando mAb anti-F_{PIV3} 4549 (E. Norrby, Stockholm) o mAb anti G_{RSV} 858-2 (Chemicon, U.S.A.) para recubrir las placas de microvaloración y un suero de conejo anti-PIV3 como anticuerpo de captura.

La radioinmunoprecipitación se realizó usando el mAb anti-F_{PIV3} 3283 (Behringwerke).

d) pNIV41118, F_{PIV3} HN_{MuV}

Las placas ELISA se recubrieron con mAb anti-F PIV3 1031215 (Norrby) o con el mAb 2072 anti-HN MuV (Örvell) y se usaron suero de conejo anti-PIV3 o suero de conejo anti-MuV como anticuerpo de captura.

La inmunoprecipitación del producto marcado se realizó usando mAb 2072 anti-HN MuV.

e) pNIV4114, F_{MuV} x G_{RSV}

Las placas ELISA se recubrieron con anti-F MuV

monoclonal 5414 (Örvell) o mAb anti G_{RSV} (Chemicon) y se usó un suero de conejo anti-SBL-1 como anticuerpo de captura.

f) pNIV4116, F_{MuV} x HN_{PIV3}

Las placas ELISA se recubrieron con mAb anti-F MuV (Örvell) o mAb anti-HN PIV3 4830 (Norrby) y suero de conejo anti-SBL-1 o un suero de conejo anti-PIV3 como anticuerpo de captura.

g) gNIV2870, F_{RSV} x G_{RSV}

Los ELISA se realizaron usando 20RG45, un suero de cabra anti-RSV (Fitzgerald, U.S.A.) para recubrir las placas de microvaloración y el mAb 19 anti-F RSV (G. Taylor, Inst. of Animal Health, Compton Lab., U.K.) como anticuerpo de captura.

B) <u>Expresión en células CHO (transformantes estables)</u>

Todos los plásmidos recombinantes se transfectaron por coprecipitación con fosfato cálcico en células CHO-K1, usando 20 μg de ADN por 1,25 x 10^6 células. Las células CHO-K1 se desarrollaron en medio GMEM-S. Los transfectantes GS se seleccionaron mediante la adición de metionina sulfoximina 25 μM al medio de cultivo dos días después de la transfección. Después de diez a catorce días, se seleccionaron las colonias resistentes y se transfirieron a placas de 96 pocillos, después cada transformante se transfirió a placas de 24 pocillos y posteriormente a matraces de 90 cm^2. Los transformantes GS se ensayaron con

respecto a los productos recombinantes cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 80%. El procedimiento sigue al descrito en Cockett y col (Bio/Technology, 1990, *8*, 662-667).

Los ELISA y la radioinmunoprecipitación de los productos radiomarcados se realizaron usando los mismos procedimientos que se han descrito anteriormente para el sistema pSFV1.

Resultados

	PSFV1		CHO			
Productos quiméricos	Expresión	Secreción	Expresión	Secreción	Tamaño (kDa)	
F_{RSV} G_{RSV}	+	+	+	+	±130	Productos homo-quiméricos
F_{PIV3} HN_{PIV3}	+	-	indetectable			
F_{MuV} HN_{MuV}	+	-	indetectable		±135	
F_{RSV} HN_{MuV}	+	+	+	+	±130	Productos hetero-quiméricos
$F_{RSV}HN_{PIV3}$	+	+	+	+	±130	
F_{PIV3} G_{RSV}	+	+	+	+	±130	
F_{PIV3} H_{MuV}	+	+	+	+	±130	
F_{MuV} G_{RSV}	+	+	+	+	±130	
F_{MuV} HN_{PIV3}	+	+	+	+	±120	

Expresión en Células de Insectos

a) Expresión en células de lepidópteros

El vector pAcUW51 es un vector lanzadera para bacterias y células de lepidópteros. Una secuencia que

codifica proteínas heterólogas puede insertarse cadena abajo del promotor p10 de baculovirus o cadena abajo del promotor de la polihedrina.

El vector pAcG67 es un vector lanzadera para bacterias y células de lepidópteros que contiene la secuencia señal de gp67 cadena arriba de un sitio de clonación múltiple. Un gen heterólogo puede insertarse en uno de los sitios de clonación y se expresará como una proteína de fusión del péptido señal de gp67 bajo el control del promotor de la polihedrina. El péptido señal de gp67 media la secreción de la proteína recombinante.

El plásmido recombinante pAcUW51 o pAcGP67 puede transfectarse junto con ADN linealizado de baculovirus en células Sf9 (Baculogold DNA, PharMIngen). Esto conduce a la generación de un stock de baculovirus recombinantes. La expresión de la proteína heteróloga recombinante se obtiene por infección de las células de insectos con el baculovirus recombinante.

El plásmido pNIV4132 o el plásmido pNIV4136 se transfectaron con ADN linealizado de baculovirus en células Sf9. Los baculovirus recombinantes 3546 (derivado de células transfectadas por pNIV4132) o 5V (derivado de células transfectadas por pNIV4136) se purificaron en placa y se usaron para infectar células Sf9 o High Five™ (Invitrogen). De 24 a 72 horas después de la infección se

recogieron las células y el medio de cultivo gastado para realizar ELISA y análisis de transferencia de Western.

Los ELISA se realizaron usando suero de cabra anti-RSV 20RG45 (Fizgerald) para recubrir las placas de microvaloración y mAb19 anti-F RSV (G. Taylor) como anticuerpo de captura.

Las transferencias de Western se realizaron usando mAb19 anti-F RSV (G. Taylor) o usando suero policlonal de cabra anti-RSV 20RG45 (Fizgerald).

El medio gastado de las células infectadas por baculovirus 3546 o por 5V dio resultados positivas en el ELISA. El nivel de expresión, que dependía de la línea de células hospedadoras (SF9 o High Five), de la multiplicidad de la infección, del medio (suero de ternero fetal suplementado o medio sintético sin suero), fue al menos 10 veces mayor que el obtenido con un clon de CHO-KI recombinante obtenido por transfección con pEE14 F_{RSV} (1-526) HN_{PiV3} (70-572)bis.

Además, el medio gastado de las células infectadas con baculovirus reaccionó positivamente en la transferencia de Western. En las inmunotransferencias estaba presente una banda cerca de los 110 kDa. Estos resultados confirman la secreción de la proteína F_{RSV}-HN_{PiV3} quimérica en el medio de las células Sf9 y High Five infectadas con los baculovirus recombinantes.

b) Purificación del producto recombinante

Las células SF9, adaptadas al medio sin suero, se infectaron con baculovirus recombinantes purificados en placa V5 o 3546. Las células se desarrollaron en suspensión en matraces Erlenmeyer de 500 ml en medio SF900II (Gibco BRL). Los medios de las células infectadas con virus se recogieron dos días después de la infección. El producto soluble de F_{RSV}-HN_{PIV3} se purificó del medio de las células infectadas por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo monoclonal anti-F RSV, mAb119. El anticuerpo monoclonal anti-F se acopló a Activated CH Sepharose 4B (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel de inmunoafinidad se lavó tres veces con 10 volúmenes de lecho de tampón A (tampón fosfato 20 mM, pH 6,4, NaCl 150 mM) antes de la introducción de la muestra. Después de 16 horas a 4°C, el gel se lavó con tampón A y el producto quimérico se eluyó con ácido fosfórico 100 mM. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente con un décimo del volumen del tampón fosfato 1 M, pH 7.

La SDS-PAGE de la proteína F_{RSV}-HN_{PIV3} purificada por inmunoafinidad reveló la presencia de una banda proteica principal de aproximadamente 110 kDa. Esta proteína se visualizó por tinción con azul de Coomassie del gel y se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-F_{RSV} (mAb19) o con el suero policlonal (20RG45) sobre

inmunotransferencias (Fig 25).

c) Producción de anticuerpos policlonales

Para obtener anticuerpos específicos, la proteína F_{RSV}-HN_{PiV3} derivada de baculovirus, purificada por inmunoafinidad como se ha descrito anteriormente, se usó para inmunizar cuatro ratones BalbC y dos conejos blancos de Nueva Zelanda. Se realizaron tres inyecciones subcutáneas de 20 µg/ml/dosis/conejo o 6 µg/100 µl/dosis/ratón a intervalos de tres semanas. Los sueros se recogieron 3 semanas después de la segunda y tercera inyecciones y la respuesta de anticuerpos se detectó usando ensayos ELISA y de transferencia de Western.

1) Ensayos ELISA

a) Respuesta de ratones

La respuesta de anticuerpos se siguió usando un suero de cabra anti-RSV (20RG45, Fitzgerald, USA) para recubrir las placas de microvaloración, y suero de ratón anti-FHN como anticuerpo de captura. Los antígenos usados fueron el Fa_{RSV}-Drosophila o el F_{RSV}-HN_{PiV3} derivado de CHO, expresado en baculovirus, y se usó el medio de células CHO transfectadas por pEE14 como control negativo.

3 de 4 sueros de ratones recogidos después de la segunda inyección mostraron algunas respuestas específicas pero bajas. Sin embargo, los sueros de ratones recogidos después de la tercera inyección mostraron un alto aumento

en el nivel de anticuerpos específicos.

b) Respuesta de conejos

La respuesta de anticuerpos se siguió usando uno de los siguientes ELISA. Los antígenos fueron los mismos que los usados para detectar la respuesta de anticuerpos de ratones. Se usaron un suero de cabra anti-RSV (20RG45, Fitzgerald, USA), un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de fusión de RSV (mAb19, Compton Lab, UK) o un anticuerpo monoclonal dirigido contra la hemaglutinina-neuraminidasa de PiV3 (mAb3285, Behring) para recubrir la placa de microvaloración, y se usó el suero de conejo anti-HN como anticuerpo de captura. La primera y segunda muestras de sangre de ensayo generaron altas concentraciones de anticuerpos específicos.

2) Ensayos de transferencia de Western

Fa-RSV CHO-KI recombinante o derivado de Drosophila, F_{RSV}-HN_{PiV3} derivado de baculovirus o el medio de cultivo gastado de CHO-pEE14 se sometieron a electroforesis sobre SDS-PAGE al 15% y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa (Amersham). El suero anti-HN de conejo, así como el suero anti-HN de ratón detectaron específicamente la proteína F o la quimera F_{RSV}-HN_{PiV3}.

Ejemplo 2

i) Optimización del uso de codones de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión de

RSV que carece del dominio de anclaje a la membrana unida a la hemaglutinina-neuraminidasa de PiV3 que carece del dominio de señal-anclaje, F_{RSV} (1-526) HN_{PiV3} (70-572) para la expresión en células de mamífero.

En la Fig. 26 puede encontrarse una tabla que muestra la comparación del uso de codones encontrado en el módulo $F_{RSV}HN_{PiV3}$ con el encontrado en un gen humano con una alta expresión. Como se indica, los codones más prevalentes encontrados en el módulo $F_{RSV}HN_{PiV3}$ tienen una A o una T en su tercera posición degenerativa, mientras que los codones prevalentes humanos tienen una C o una G. Para mejorar la expresión de la proteína $F_{RSV}HN_{PiV3}$, se modificó de nuevo la secuencia codificante entera por ingeniería genética para ajustarse mejor al uso de codones humanos. La secuencia modificada por ingeniería genética se obtuvo usando oligonucleótidos largos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procedimientos de clonación convencionales.

Modificación de la secuencia codificante del módulo $F_{RSV}HN_{PiV3}$ por ingeniería genética

La secuencia sintética entera se recuperó uniendo tres fragmentos de PCR (A, B y C). La estrategia general para obtener cada fragmento de PCR se representa esquemáticamente en la Fig. 27. Consta del montaje de oligonucleótidos largos solapantes en una primera vuelta de

amplificación. El fragmento de tamaño completo resultante se amplifica adicionalmente usando dos cebadores cortos localizados en cada uno de sus extremos.

Construcción del fragmento A

El primer fragmento de PCR, que corresponde a 18 bases que codifican sitios de restricción, seguidas por las bases 1 a 1269 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, seguidas por 8 bases que codifican sitios de restricción, se obtuvo por el montaje de PCR de 18 oligonucleótidos solapantes (Fig. 28). Este fragmento se ha insertado en el vector de clonación pCRIITOPO (Invitrogen). Después de la secuenciación del fragmento, se recuperó del vector pCRIITOPO por una digestión con *XbaI* y *BsrGI* y se insertó en los sitios correspondientes de pNIV4120. El módulo correspondiente a $F_{RSV}HN_{PiV3}$ con las bases 1 a 1264 humanizadas después se recuperó por una digestión con *XbaI* y *EcoRI* y se insertó en los sitios correspondientes de pEE14 (Fig. 29) generando pEE14xF_{RSV}humHN_{PiV3}.

Construcción del fragmento B

El segundo fragmento de PCR, B, que corresponde a 13 bases que codifican sitios de restricción únicos seguidos por las bases 1264 a 2136 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, se obtuvo montando 10 oligonucleótidos cuyas secuencias pueden encontrarse en la Fig. 30. Este fragmento se ha insertado en el vector pCRIITOPO y se ha secuenciado. Este fragmento se ha

recuperado por una digestión con *BrsGI* y *KpnI*.

Construcción del fragmento C

El tercer fragmento de PCR que corresponde a las bases 2023 a 3039, seguido por 6 bases extra que codifican un sitio EcoRI, se ha montado a partir de los 15 oligonucleótidos mostrados en la Fig. 31. Este fragmento se ha insertado en el vector de clonación PCRIITOPO y se ha secuenciado. Este fragmento se ha recuperado por digestión con *KpnI* y *EcoRI* (Fig. 31).

Construcción de la secuencia codificante entera

La secuencia codificante entera con codones optimizados de $F_{RSV}HN_{PiV3}$ se ha obtenido mediante montando los fragmentos A, B y C como se muestra en la Fig. 32. pNIV4120, en el que el fragmento de PCR A ha reemplazado a la secuencia original (véase la Fig. 29) se digirió con *BsrGI* y *EcoRI*. La secuencia original se eliminó y se reemplazó por el fragmento B *BsrGI-KpnI* y el fragmento C *KpnI-EcoRI*. El módulo con los codones optimizados se recuperó del vector PCRIITOPO con *XbaI* y *EcoRI* y se insertó en los correspondientes sitios del vector pEE14. El plásmido resultante, pEE14F_{RSV}humHN$_{PiV3}$hum, codifica para la secuencia codificante humanizada entera. La secuencia de los ácidos nucleicos de $F_{RSV}HN_{PiV3}$ humanizado se muestra en la Fig. 33.

Expresión en células CHO-KI

La pEE14F_{RSV}humHN$_{PiV3}$ recombinante (véase la construcción del fragmento A, anterior, o pEE14F_{RSV}humHN$_{PiV3}$hum recombinante, véase la construcción de la secuencia codificante entera, mostrada anteriormente) se transfectó usando el reactivo FuGene (Boeringer Mannheim), usando 5 μg de ADN por 1,25 x 10^6 células. Las células CHO-KI se desarrollaron en medio GMEM-S. Los transfectantes GS se seleccionaron mediante la adición de metionina sulfoximina 25 μM al medio de cultivo dos días después de la transfección. Después de diez a catorce días, se seleccionaron las colonias resistentes y se transfirieron a placas de 96 pocillos. Cada transformante después se transfirió a placas de 24 pocillos y posteriormente a matraces de 80 cm^2. Los transformantes GS se ensayaron con respecto al producto recombinante cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80%. El procedimiento sigue el descrito en Cockett y col. (Bio/Technology, 1990, *8*, 662-667). Alternativamente, la expresión se evaluó de tres a cinco días después de la adición de butirato sódico (2 mM) en el cultivo celular.

Para comparar el nivel de expresión con el de F_{RSV}HN$_{PiV3}$ no humanizado, se realizaron ensayos ELISA usando 20RG45, un suero de cabra anti-RSV (Fizgerald, U.S.A.) para recubrir las placas de microvaloración y el mAb19 anti-F de RSV (G. Taylor, Inst. of Animal Health, Compton Lab, U.K.)

como anticuerpo de captura. El nivel de expresión se estimó usando un Fa-$_{RSV}$ purificado expresado en el sistema de Drosophila.

El nivel de expresión del producto expresado no humanizado por pEE14F$_{RSV}$HN$_{PiV3}$ no excedía de 0,03 mg/l y de 0,1 mg/l cuando se añadía butirato sódico al medio de cultivo. El nivel de expresión del producto parcialmente humanizado expresado por pEE14F$_{RSV}$humHN$_{PiV3}$, alcanzó 1 mg/ml y hasta 3 mg/ml cuando se añadió butirato sódico al medio de cultivo. Por lo tanto, la humanización de la secuencia codificante para los aminoácidos 1-423 de los 1029 aminoácidos aumentó el nivel de expresión hasta 30 veces (véase la Figura 34a).

El nivel de expresión del producto totalmente humanizado expresado por pEE14F$_{RSV}$humHN$_{PiV3}$hum fue al menos de 2 mg/l y alcanzó hasta 50 mg/l cuando se añadió butirato sódico al medio de cultivo. Por lo tanto, la humanización de la región codificante entera de F$_{RSV}$HN$_{PiV3}$ aumentó el nivel de expresión de al menos 200 a 500 veces (véase la Figura 34b).

ii) Optimización del uso de codones de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión del virus de la parotiditis (MuV) que carece del dominio de anclaje a la membrana, unida al virus del sarampión (MV) que carece del dominio de señal-anclaje, F$_{MuV}$ (1-482) H$_{MV}$

(59-617) para la expresión en células de mamífero.

En la Fig. 35 puede encontrarse una tabla que muestra la comparación del uso de codones encontrado en el módulo $F_{MuV}H_{MV}$ con el encontrado en un gen humano de alta expresión. Como puede verse, las frecuencias del uso de codones de este gen quimérico son bastante diferentes de las prevalentes en el genoma humano. Para mejorar la expresión de la proteína $F_{MuV}H_{MV}$, se ha modificado por ingeniería genética la secuencia codificante entera para ajustarla mejor al uso de codones humanos. La secuencia modificada por ingeniería genérica se obtuvo usando oligonucleótidos sintéticos largos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procedimientos de clonación convencionales.

Modificación por ingeniería genética de la secuencia codificante del módulo $F_{MuV}H_{MV}$

La secuencia sintética entera se recuperó uniendo cuatro fragmentos de PCR (A, B, C y D). La estrategia general para obtener cada fragmento de PCR se representa esquemáticamente en la Fig. 36. Consta del montaje de oligonucleótidos largos solapantes en una primera vuelta de amplificación. El fragmento de tamaño entero resultante se amplifica adicionalmente usando dos cebadores cortos localizados en cada uno de sus extremos.

Construcción del fragmento A

El primer fragmento de PCR, que corresponde a 13 bases

que especifican sitios de restricción y un motivo consenso de Kozak seguido por las bases 1 a 1026 de $F_{MuV}H_{MV}$, se obtuvo por el montaje de PCR de 12 oligonucleótidos solapantes (Fig 37). Este fragmento se ha insertado en el vector de clonación pCRIITOPO (Invitrogen). Después de la secuenciación del fragmento, se recuperó del vector pCRIITOPO por una digestión con *XbaI* y *TspRI* y se purificó un fragmento de 963 pb, conduciendo al fragmento A.

Construcción del fragmento B

El segundo fragmento de PCR, B, que corresponde a las bases 965 a 1712 de $F_{MuV}H_{MV}$ se obtuvo montando 9 oligonucleótidos cuyas secuencias pueden encontrarse en la Fig. 38. Después de su inserción en el vector pCRIITOPO y de su secuenciación, este fragmento de 785 pb se ha recuperado por digestión con *TspRI* y *AvaI*.

Construcción del fragmento C

El tercer fragmento de PCR, C, que corresponde a las bases 1712 a 2485, se ha montado a partir de los 11 oligonucleótidos mostrados en la Fig. 39. Se ha insertado en el vector de clonación PCRIITOPO y se ha secuenciado. Este fragmento de 774 pb se ha recuperado por digestión con *AvaI* y *ApaI*.

Construcción del fragmento D

El cuarto fragmento de PCR, D, correspondiente a las bases 2485 a 3139 seguidas por 8 pb que especifican un solo

sitio de restricción, se ha montado a partir de los 8 oligonucleótidos mostrados en la Fig. 40. Este fragmento se ha insertado en el vector pCRIITOPO y se ha secuenciado. Se ha recuperado un fragmento de 657 pb después de la digestión con *ApaI* y *EcoRI*.

Construcción de la secuencia codificante entera

La secuencia codificante con codones optimizados entera de $F_{MuV}H_{MV}$ se ha obtenido mediante el montaje de los fragmentos A, B, C y D e insertando el módulo digerido con *XbaI* y *EcoRI* en los sitios correspondientes del vector pEE14 (Fig. 41). El plásmido resultante, pEE14F_{MuV}humH_{MV}hum, codifica para una secuencia humanizada que codifica para los aa 1-482 de la proteína de fusión del virus de la parotiditis, seguidos por los aa 59-617 del virus del sarampión. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos humanizada y original de $F_{MuV}H_{MV}$ se muestran en la Fig. 42.

iii) Purificación y análisis de FHN expresada en CHO-KI

a) Purificación

Se cultivó una línea de células CHO que expresaba FHN recombinante secretada en una fábrica de células, en medio G-MEM suplementado con un 2% de FCS, en presencia o ausencia de un 1% de Butirato Na. La FHN se purificó por cromatografía de inmunoafinidad cargando el medio de cultivo gastado sobre una columna de Mab19-sepharose como

se describe, usando las mismas condiciones experimentales.

Cuando se expresó en ausencia de Butirato Na, la FHN purificada migró sobre SDS-PAGE, en condiciones de calentamiento y reducción, principalmente como una banda de 110 kDa. Por el contrario, la FHN se visualiza como un triplete de 110, 120 y 130 kDa cuando las células CHO se cultivan con butirato. El calentamiento tiene un efecto más drástico que el reductor sobre la migración electroforética de FHN. De hecho, se detectan claramente especies de alto peso molecular en la preparación cuando la electroforesis se realizaba sin el calentamiento, lo que sugiere la presencia de agregados u oligómeros de FHN. Estos agregados no parecían estar contaminados por proteínas CHO. Los anticuerpos dirigidos contra proteínas CHO no reconocían específicamente ninguna banda de la transferencia de Western. Se realizó un análisis de glicano usando varias lectinas específicas para diferentes radicales de carbohidrato. Sorprendentemente, la FHN no llevaba ácidos siálicos o estructuras con alto contenido de manosa, sino carbohidratos de tipo de galactosa-acetil-galactosamina característicos de las N- y/o O-glicosilaciones de los híbridos.

El análisis de la microsecuencia N-terminal mostró principalmente la presencia de una subunidad F1 en bandas de 110-130 kDa. La secuencia de aminoácidos N-terminal de

F2 detectada en bandas de peso molecular inferior y superior indicó que algunas moléculas de FHN purificadas están presentes bajo una forma F0 (F no madura).

La presencia de agregados u oligómeros en las preparaciones de FHN se confirmó mediante análisis de exclusión molecular y las proteínas se detectaron por difusión de luz láser. Fueran cuales fueran las condiciones de cultivo (con butirato o sin butirato), entre un 50% y un 65% de las poblaciones de FHN presentaron un peso molecular mayor de 10^6 Da, lo que demuestra que la FHN se agrega. De un 5 a un 15% de estas proteínas tienen un peso molecular que varía entre 400 y 900 kDa, mientras que de un 30 a un 35% son FHN monomérica.

b) Análisis de inmunoglobulinas en suero

Protocolo de inmunización

La proteína $F_{RSV}HN_{PiV3}$ se purificó a partir del medio de cultivo gastado de las células CHO-KI transfectadas por la pEE14F_{RSV}humHN_{PiV3}hum recombinante mediante cromatografía de inmunoafinidad como se describe (Purificación del producto recombinante expresado en células SF9 infectadas recombinantes de baculovirus). El producto se inyectó en 7 grupos de ratones Balb C1 como se describe en la siguiente tabla 1.

Respuesta humoral dirigida contra la proteína FHN

Se determinó la respuesta humoral dirigida contra la

proteína FHN. Para este fin, se recubrieron placas ELISA con la proteína FHN purificada por inmunoafinidad.

IgG Total (Fig 43)

Para detectar la IgG total contra-FHN, las placas ELISA se recubrieron con 200 ng de proteína FHN purificada por inmunoafinidad, después las placas se saturaron y se aplicaron diluciones del segundo suero sanguíneo de ratones. Las IgG totales se detectaron usando suero biotinilado dirigido contra IgG de ratón.

IgG1 (Fig 44)

Para detectar la IgG1 anti-FHN específica, las placas ELISA se recubrieron con 100 ng de proteína FHN purificada por inmunoafinidad, después las placas se saturaron y se aplicaron diluciones del segundo suero sanguíneo de ratones. La IgG1 se detectó usando un suero biotinilado dirigido contra la IgG1 de ratón.

IgG2a (Fig 45)

Para detectar la IgG2a anti-FHN específica, las placas ELISA se recubrieron con 100 ng de proteína FHN purificada por inmunoafinidad, después las placas se saturaron y se aplicaron diluciones del segundo suero sanguíneo de ratones. La IgG2a se detectó usando suero biotinilado dirigido contra IgG2a de ratón.

Se determinó la concentración de cada suero, se calculó la concentración media para cada grupo y ésta se

presenta en la tabla 2. Estos experimentos muestran que el antígeno FHN por sí mismo o formulado con un adyuvante (grupo 1 a 3), estimula una respuesta humoral específica. De hecho, no se genera ningún anticuerpo anti-FHN en el grupo de control no tratado (grupo 5) o en el grupo inmunizado solamente con el adyuvante (grupo 4). El adyuvante del grupo 1 (y del grupo 4) era 3D-MPL y QS21 formulados con liposomas que contenían colesterol como se describe en el documento WO 96/33739; el adyuvante del grupo 2 fue alumbre.

La relación IgG1/IgG2a indica la orientación Th1 o Th2 de la respuesta inmune; (Tabla 2), una respuesta protectora contra RSV o PiV3 tendería hacia el tipo Th1, que es una baja relación IgG1/IgG2a. A este respecto, las respuestas generadas con la FHN formulada en presencia de adyuvante 3D-MPL + QS21 parecen ser las más prometedoras.

Tabla 1: Procedimientos experimentales

Inmunogenicidad de FHN en ratones

Grupo	n	Vol (µl)	ruta	Antigeno		Inmuno-estimulantes	tampón	conservante
				Naturaleza	dosis (µg)			
1	12	2x50	IM	FHN	2	3D-MPL/ QS21	PBS mod pH 7,4	baja conc. de tiomersal (1µg/ml)
2	12	2x50	IM	FHN	2	Al(OH)3	PBS mod pH 7,4	baja conc. de tiomersal (1µg/ml)
3	12	2x50	IM	FHN	2	/	PBS mod pH 7,4	baja conc. de tiomersal (1µg/ml)
4	12	2x50	IM	/	/	3D-MPL/ QS21	PBS mod pH 7,4	baja conc de tiomersal (1µg/ml)
5	12	/	/	sin tratar	/	/	/	/
6	12	2x30	INA	RSV vivo		/	/	/
7	12	2x30	INA	PIV-3 vivo		/	/	/

IM = intramuscular

INA = intranasal

Antígeno	cc. µg/ml	Tampón
RSV vivo	6,2 logPFU/ml	
PIV-3 vivo	6,7 logPFU/ml	
FHN	120 (2,5ml)	PBS pH 7,3

Programa de tiempo:

Inyección 1 = Día 0

Inyección 2 = Día 28

Primera Hemorragia = Día 28

Segunda Hemorragia = Día 42

Tabla 2: Respuesta de anticuerpos en suero contra FHN

Se determinaron las IgG totales, la IgG1 y la IgG2a para cada suero de ratón. Después se calculó la concentración media para cada grupo y se presenta en la tabla.

Grupo nº	Inmunógeno	IgG total	IgG1	IgG2a	IgG1/IgG2a
1	FHN + 3D-MPL/QS21	1182000	109800	305500	0,36
2	FHN + Alumbre	182200	127100	4429	28,7
3	FHN	44990	22760	1941	11,73
4	Adyuvante = del grupo 1	49	32	ND	ND
5	no tratado	52	ND	ND	ND
6	RSV vivo	12840	748	2718	0,27
7	PiV3 vivo	10860	2758	2320	1,19

ND = no determinado, siendo la concentración baja

Referencias

Haas, J., Park E-C y Seed B., Codon usage limitation in the expression of HiV-1 envelope glycoprotein, Current Biology,

1996, 6, n° 3, 315-325.

Kim C. H., Oh Y. y Lee T.H., Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells, Gene, 1997, 199, 293-301.

Zolotukhin S., Potter M. Hauswirth W.W. Guy J. Muzyczka N. A Humanized green fluorescent protein cDNA adapted for high level expression in mammalian cells. J. of Virology, July 1996, 70, n° 7, 4646-4654.

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una proteína heteroquimérica o un derivado inmunogénico de la misma que comprende un fragmento inmunogénico de la proteína de fusión (F) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV y un fragmento inmunogénico de la proteína de unión (G, HN o H) de RSV, PIVI, PIV2, PIV3, MV o MuV, procedimiento que comprende la expresión de un ADN recombinante que codifica la proteína heteroquimérica o el derivado inmunogénico de la misma en células CHO y la recuperación de la proteína.

2. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1 en el que el ADN que codifica la proteína heteroquimérica tiene un codón optimizado con respecto por lo menos a un codón en el gen natural o ADN.

3. Una proteína heteroquimérica o un derivado inmunogénico de la misma, que comprende un fragmento inmunogénico de la proteína de fusión (F) de RSV, PIV1,

PIV2, PIV3, MV o MuV y un fragmento inmunogénico de la proteína de unión (G, HN o H) de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MuV o MV, con la condición de que cuando uno de los fragmentos inmunogênicos procede de RSV F, RSV G o PIV3 F, PIV3 HN, el otro fragmento inmunogênico procede de MuV F, Muv HN, MV F, MV H, PIV1 F, PIV1 HN, PIV2 F o PIV2 HN.

4. Un procedimiento para preparar una proteína heteroquimérica o derivado inmunogénico de la misma de acuerdo con la reivindicación 3, procedimiento que comprende expresar un ADN recombinante que codifica la proteína heteroquimérica o el derivado inmunogénico de la misma en uno cualquiera de: células CHO o células de insecto, y recuperar la proteína.

5.- Una proteína de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el fragmento inmunogénico de la proteína F carece del dominio de anclaje a la membrana en su extremo C-terminal.

6. Una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 5, en la que el fragmento inmunogénico de la proteína G, HN o H carece del dominio de señal/anclaje en su extremo N-terminal.

7. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 ó 6, que está unida a través de un aminoácido de la parte C-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV a un aminoácido de la parte N-terminal del fragmento inmunogénico de la proteína G de RSV, la proteína HN de PIV1, PIV2, PIV3, MuV o la proteína H de MV.

8. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5, 6 ó 7, que comienza en su extremo N-terminal con una secuencia señal de la proteína F de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV o MuV.

9. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5, 6 ó 7, que comienza en su extremo N-terminal con una secuencia señal de TPA.

10. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 8, que comprende una secuencia líder de ubiquitina.

11. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 3 ó 5 a 9, que comprende una cola de polihistidina.

12. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 10 ó 11, que comprende un sitio de escisión para escindir la secuencia líder de ubiquitina y/o la cola de polihistidina.

13. Una proteína heteroquimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 11, que se selecciona entre el grupo compuesto por:

$Fs^{+}a^{-}RSVxHNs^{-}a^{-}MuV$;

$Fs^{+}a^{-}PIV3$ x $HNs^{-}a^{-}MuV$;

$Fs^{+}a^{-}MuV$ x $Gs^{-}a^{-}RSV$; o

$Fs^{+}a^{-}MuV$ x $HNs^{-}a^{-}PIV3$, o

derivados inmunogénicos de las mismas.

En donde los significados de S, a, (+) y (-) son como sigue:

"S" dominio simple

"a" dominio amplio

"(+)" dominio presente

"(-)" dominio ausente

14. Una proteína heteroquimérica de acuerdo con una

cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 11, que se selecciona entre el grupo compuesto por:

$Fs^{+}a^{-}$MuV x $Hs^{-}a^{-}$MV; o
$Fs^{+}a^{-}$RSV x $HNs^{-}a^{-}$PIV1; o
$Fs^{+}a^{-}$RSV x $HNs^{-}a^{-}$PIV2, o
un derivado inmunogénico de las mismas.

15. Una proteína heteroquimérica que es:

$Fs^{+}a^{-}$ (1-526) RSV x $HNs^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3,
$Fs^{+}a^{-}$ (1-492) PIV3 x $Gs^{-}a^{-}$ (69-298) RSV,
$Fs^{+}a^{-}$ (1-526) RSV x $HNs^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3 bis,
$Fs^{+}a^{-}$ (1-526) RSV x $HNs^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3 ent his,
o
sTPA (1-21) UB (1-74) ent $Fs^{-}a^{-}$ (24-526) x HN $s^{-}a^{-}$ (70-572) PIV3, o un derivado inmunogénico de las mismas.

16. ADN recombinante que codifica una proteína heteroquimética o un derivado inmunogénico de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 15.

17. Un ADN recombinante conforme a la reivindicación 16,

en el cual por manipulación se optimiza el uso de codones en un reemplazo mutuo de los mismos donde uno de ellos codifica el mismo aminoácido.

18. Un vector de expresión que comprende ADN recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 17.

19. Un hospedador transformado con el ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17 o con un vector de acuerdo con la reivindicación 18.

20. Un hospedador de acuerdo con la reivindicación 19, que es una célula CHO.

21. Un hospedador de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado por constituir una célula de insecto lepidóptero.

22. Una composición de vacuna que comprende una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 13, o un derivado inmunogénico de la misma, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende además monofosforil lípido A 3D y/o QS-21.

24. Una composición de vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 22 ó 23, en la que el vehículo es una emulsión de aceite en agua.

25. Una proteína heteroquimérica o un derivado inmunogénico de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 15, para uso en medicina.

26. Un procedimiento para la producción de una proteína heteroquimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 15, procedimiento que comprende expresar un ADN recombinante que codifica dicha proteína o un fragmento inmunogénico de la misma en una célula hospedadora de CHO o de insecto, y recuperar la proteína.

27. Un procedimiento de tratamiento de un ser humano o animal susceptible a infecciones virales por paramixovirus, que comprende administrar una cantidad eficaz de una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 22 a 24.

28. Proteína heteroquimérica o derivado inmogénico de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 15 anteriores, como ingrediente en la preparación de compuestos médicos para el tratamiento de transtornos respiratorios.

Resumen

Nuevos Compuestos

Se describen proteínas heteroquiméricas o derivados inmunogénicos de las mismas que comprenden fragmentos inmunogénicos de glicoproteínas de fusión y de unión de RSV, PIV1, PIV2, PIV3, MV y MuV. Tales proteínas heteroquiméricas pueden expresarse, en particular, en células CHO y pueden usarse en composiciones de vacuna para tratar trastornos respiratorios tales como los producidos por antígenos virales de paramixovirus.

Figura 1

pNIV2819

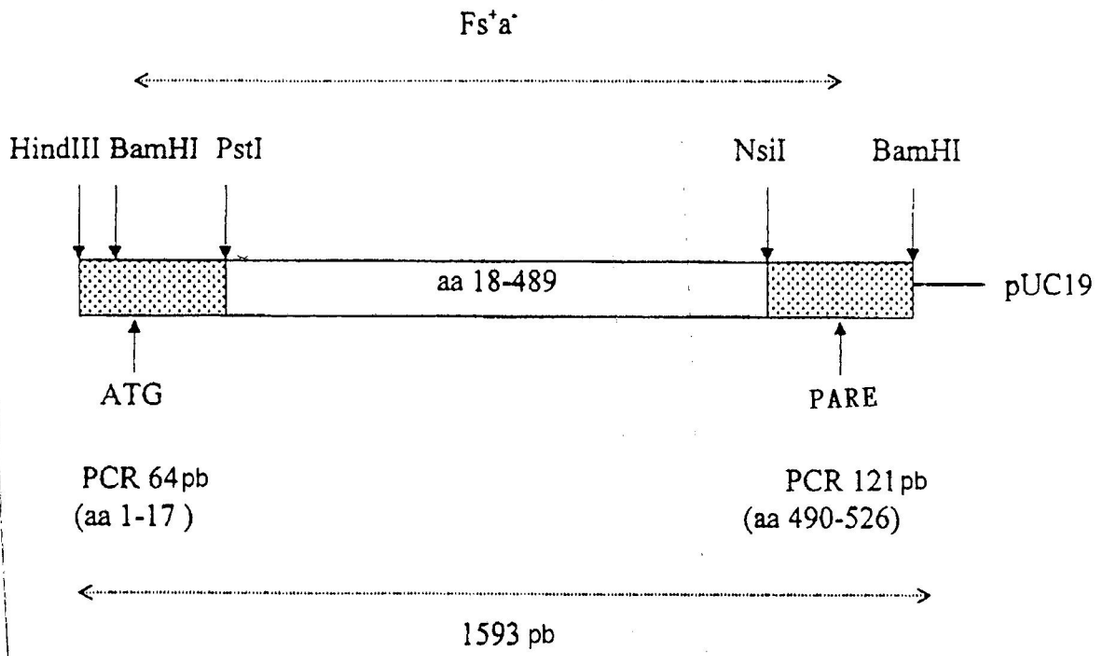
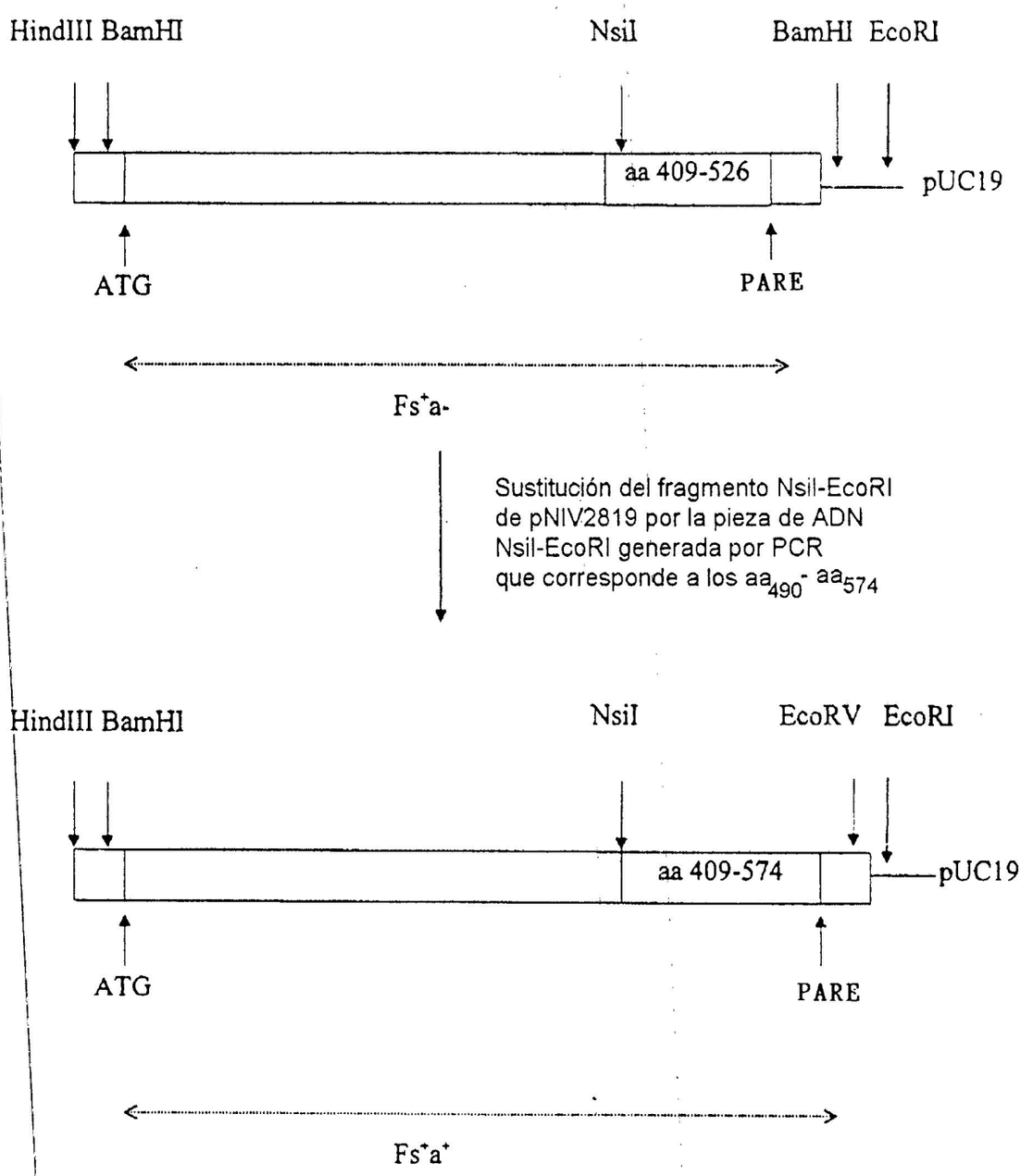


Figura 2

pNIV2820



251
00255

Figura 3

pNIV2841

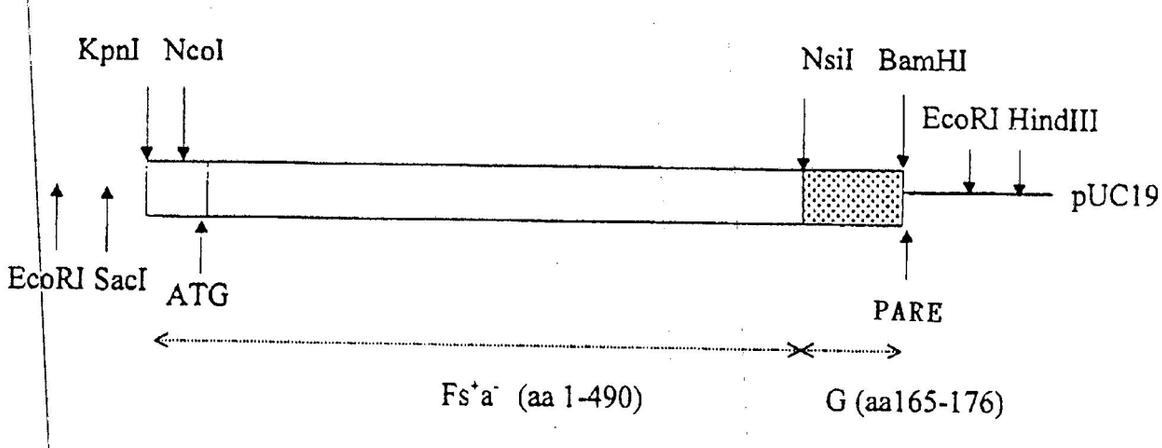


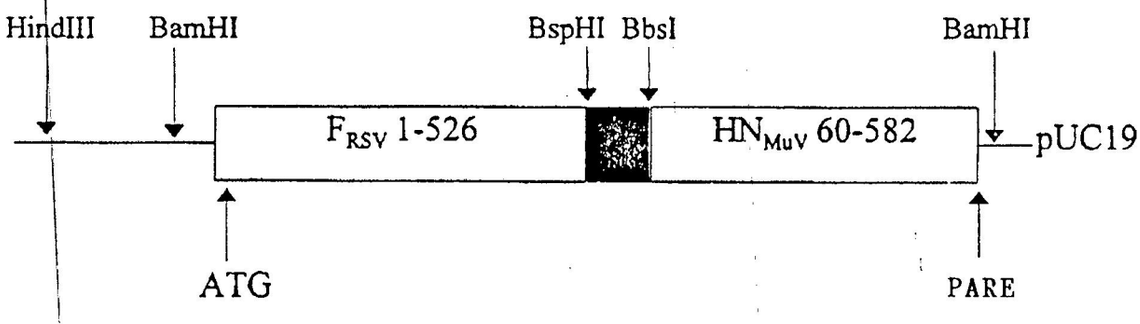
Figura 4

A) Adaptadores sintéticos

```
5' C ATG AAT GAT CAA GGC TTG AGC AA 3'
     TTA CTA GTT CCG AAC TCG TTA GTC   [SEC ID NO: 1]
```

BspHI BbsI

B) pNIV4102



C) pNIV4104

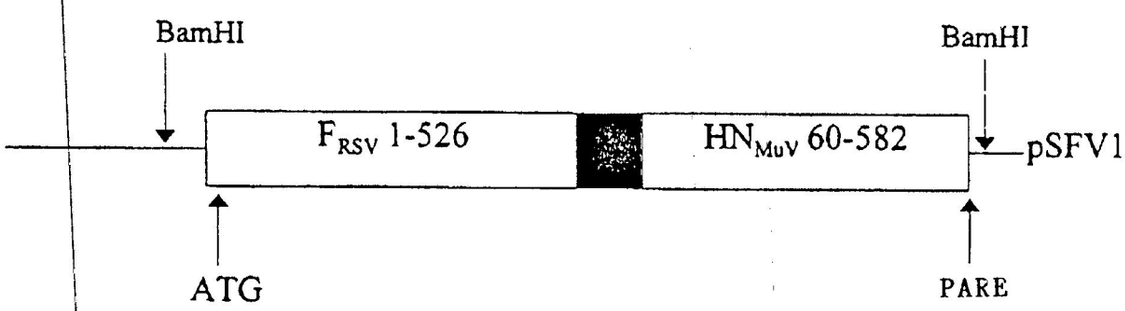


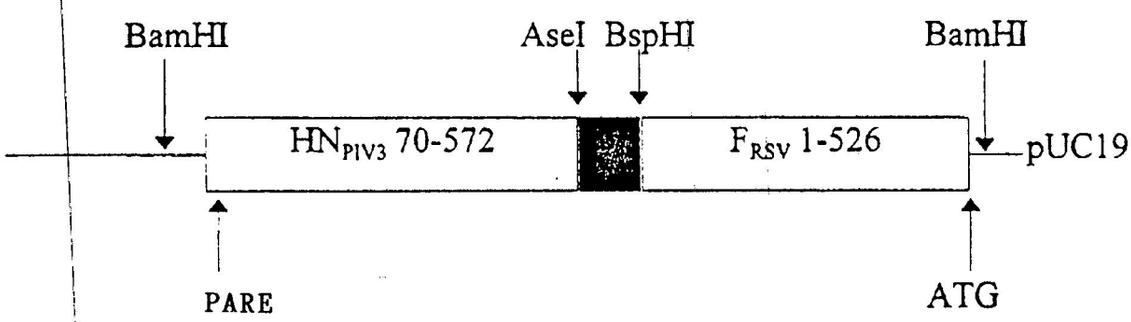
Figura 5

A) Adaptadores sintéticos

```
5' C ATG AAC AAT GAG TTT ATG GAA GTT ACA GAA AAG ATC CAA
       TTG TTA CTC AAA TAC CTT CAA TGT CTT TTC TAG GTT
  BspHI

ATG GCA TCG GAT ATT AT 3'
TAC CGT AGC CTA TAA TATA     [SEC ID NO: 2]
                  AseI
```

B) pNIV4109



C) pNIV4110

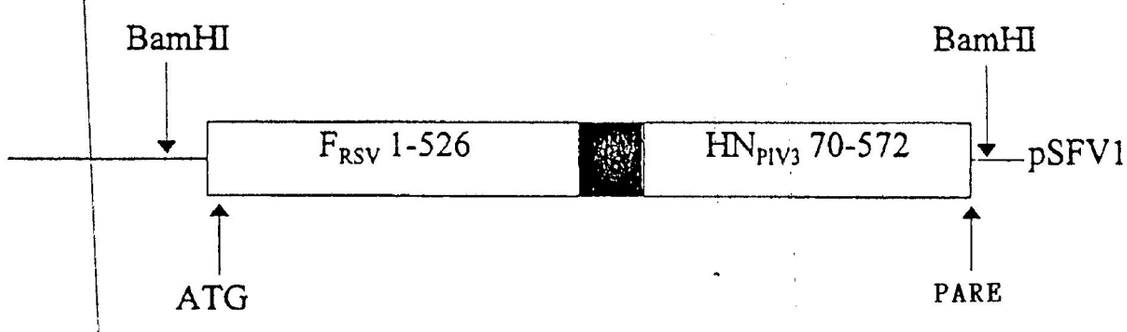


Figura 6

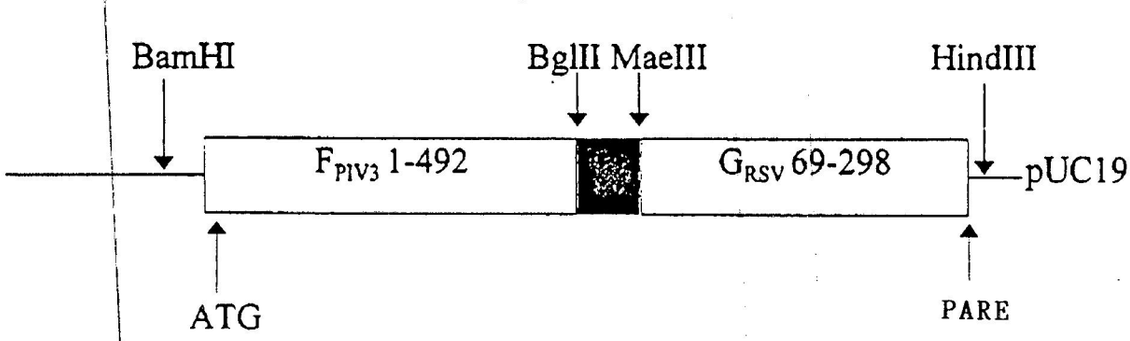
A) Adaptadores sintéticos

```
5' GAT CTA GAA GAG TCA AAA GAA TGG ATA AGA AGG TCA AAT CAA
      AT CTT CTC AGT TTT CTT ACC TAT TCT TCC AGT TTA GTT
 BglII

AAA CTA GAT TCC ATT GGA AAT TGG CAT CAA TCT AGC ACC 3'
TTT GAT CTA TGG TAA CCT TTA ACC GTA GTT AGT TCG TGG CAGT G
                                                  MaeIII
```

[SEC ID NO: 3]

B) pNIV4103



C) pNIV4106

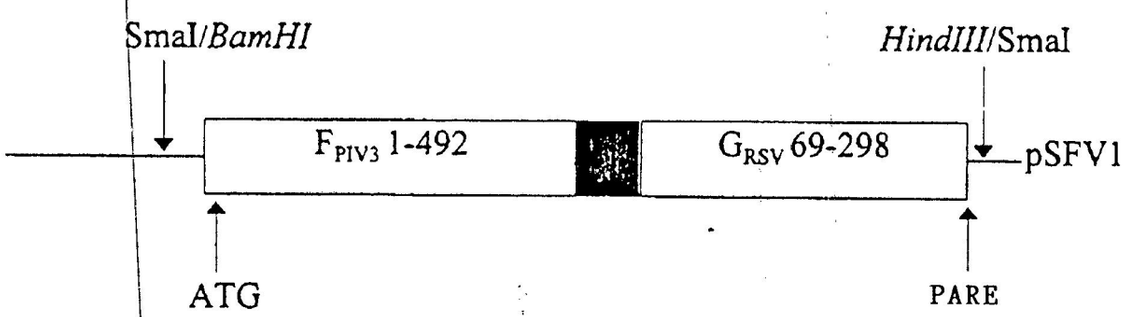


Figura 7

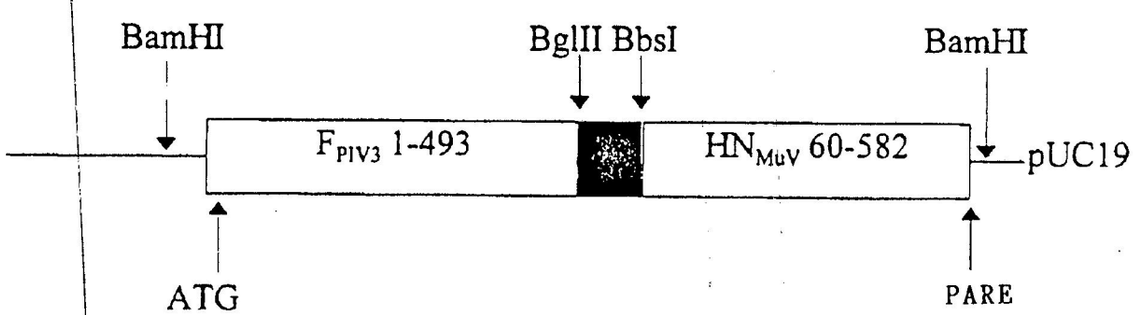
A) Adaptadores sintéticos

```
5'G ATC TAG AAG AGT CAA AAG AAT GGA TAA GAA GGT CAA ATC
       ATC TTC TCA GTT TTC TTA CCT ATT CTT CCA GTT TAG
 BglII

AAA AAC TAG ATT CCA TTG GAA ATT GGC ATC AAT CTA GCA CCA
TTT TTG ATC TAA GGT AAC CTT TAA CCG TAG TTA GAT CGT GGT


CAA ATG ATC AAG GCT TGA GCA A 3'
GTT TAC TAG TTC CGA ACT CGT TAGTC      [SEC ID NO: 4]
                              BbsI
```

B) pNIV4117



C) pNIV4118

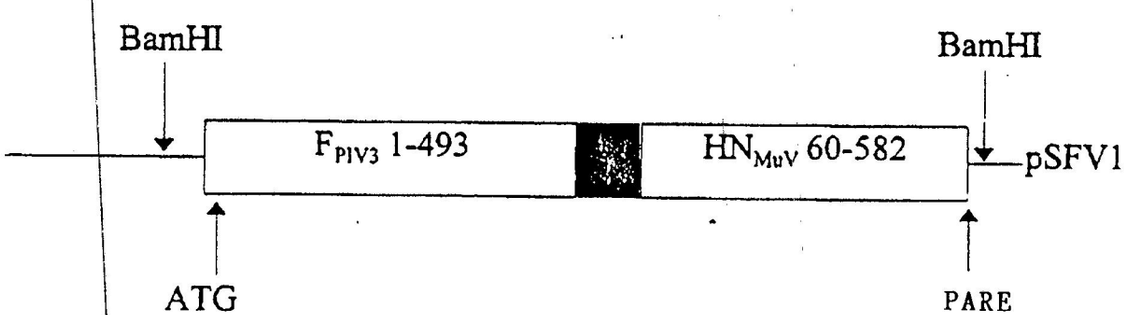


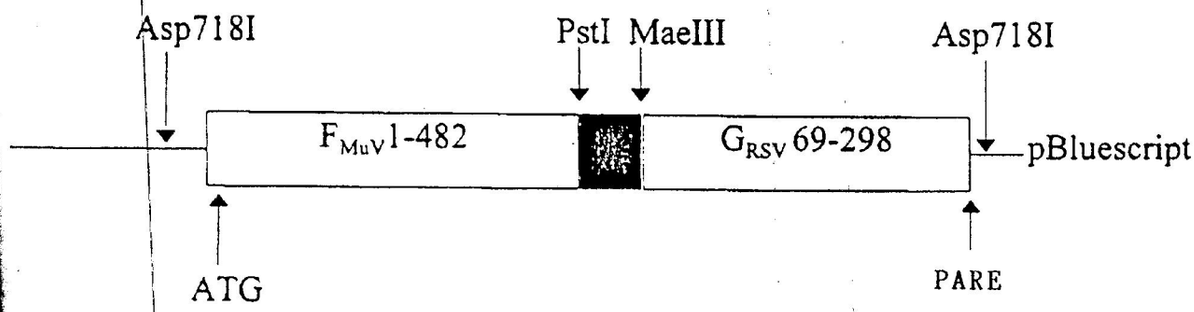
Figura 8

A) Adaptadores sintéticos

```
5'      GAA TGC CGT TAA ATA CAT CAA GAG AGT AAC CAT CAA
  A CGT CTT ACG GCA ATT TAT GTA GTT CTC TCA TTG GTA GTT
 PstI

CTC CAT CGG TCT CAG TAA GTT CTA AA  3'
GAG GTA GCC AGA GTC ATT CAA GAT TTC AGT        [SEC ID NO: 5
                                    MaeIII
```

) pNIV4113



C) pNIV4114

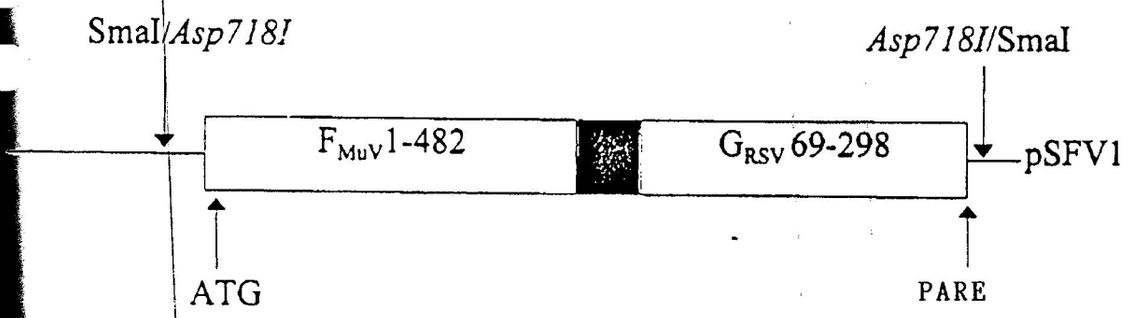
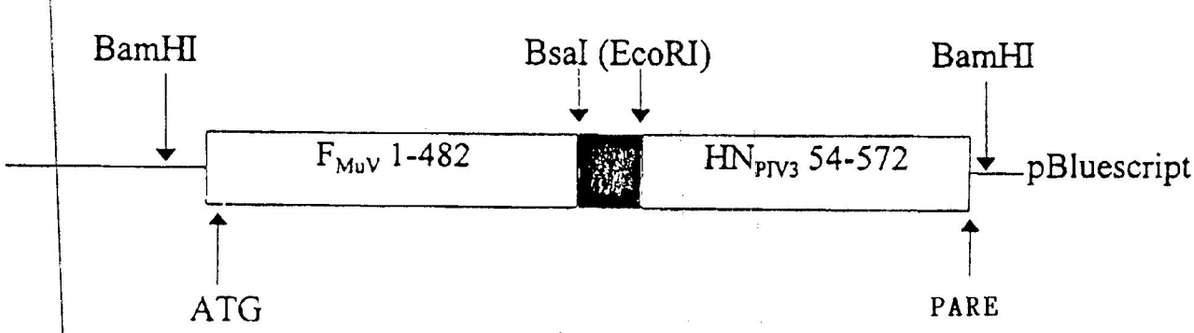


Figura 9

A) Adaptadores sintéticos

5' GTAAGTTCTAAA 3'
CAAGATTTTTAA [SEC ID NO: 6]
BsaI EcoRI

B) pNIV4115



C) pNIV4116

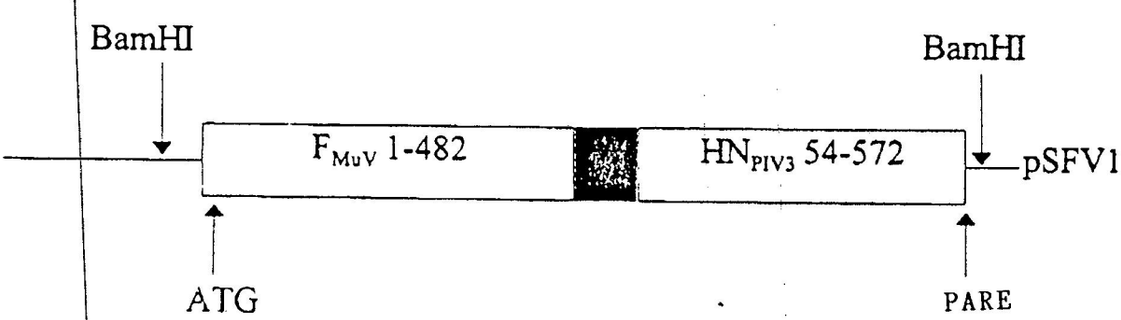
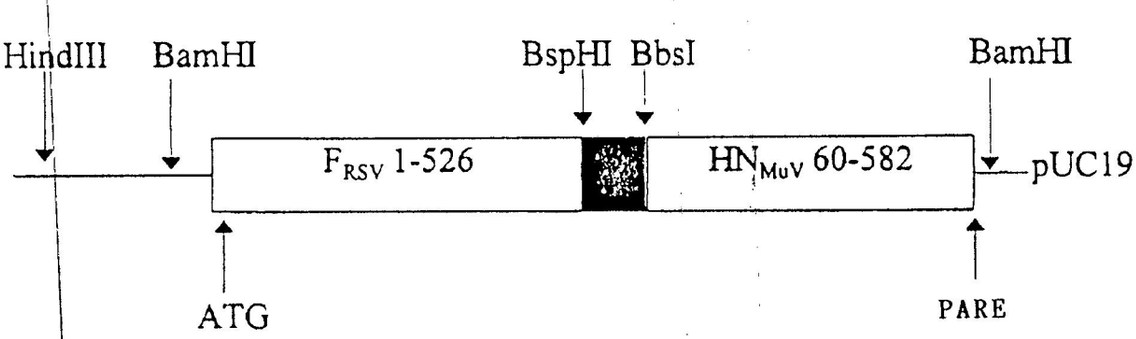


Figura 10

A) pNIV4102



C) pEE14 $Fs^{+}a^{-}$ RSV x HN $s^{-}a^{-}$ MuV

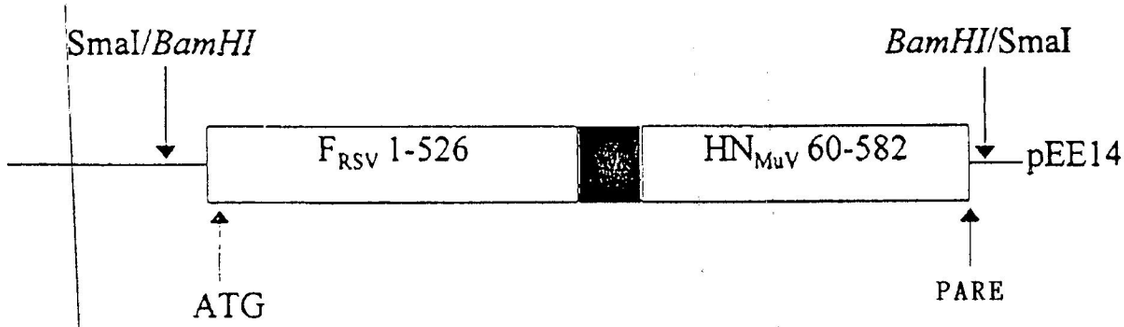
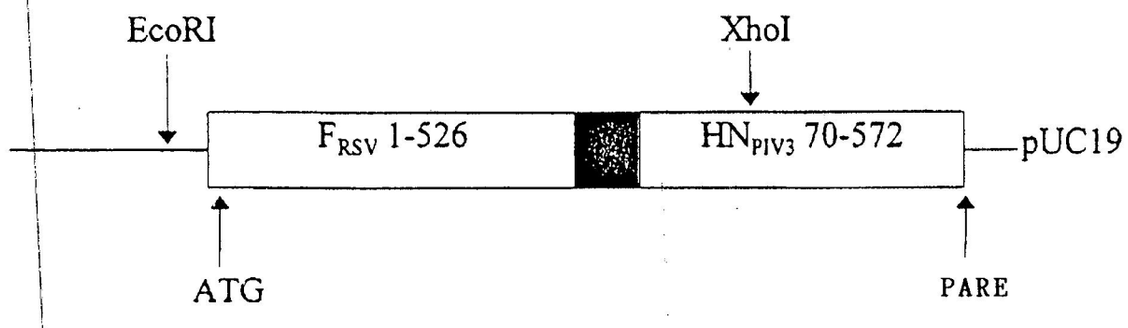


Figura 11

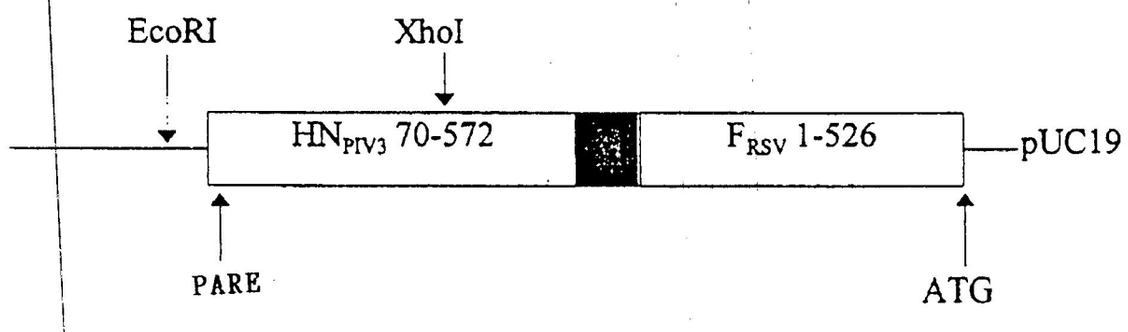
259

00263

A) pNIV4105



B) pNIV4109



C) pEE14 $Fs^{+}a^{-}$ RSV x HN $s^{-}a^{-}$ PIV3

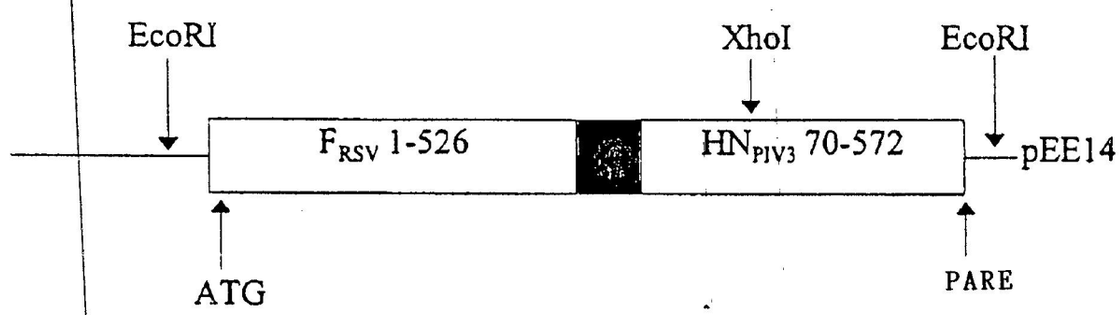
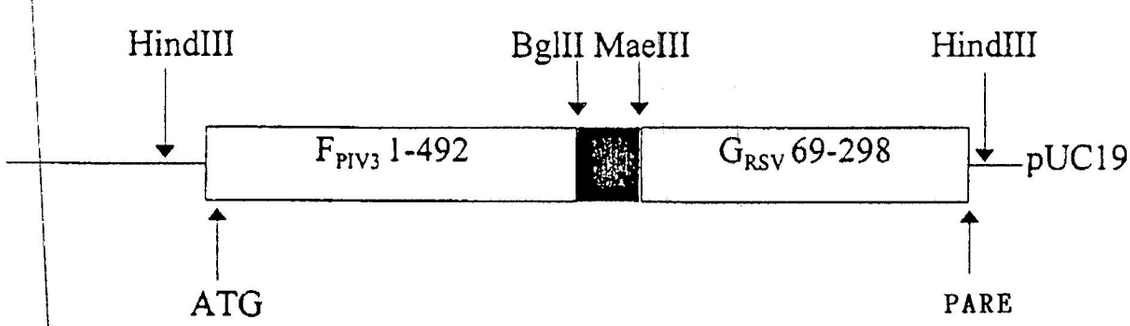
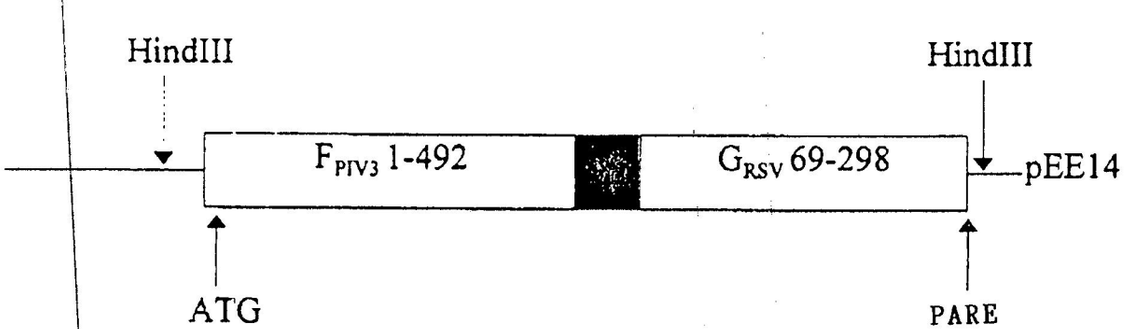


Figura 12

A) pNIV4103



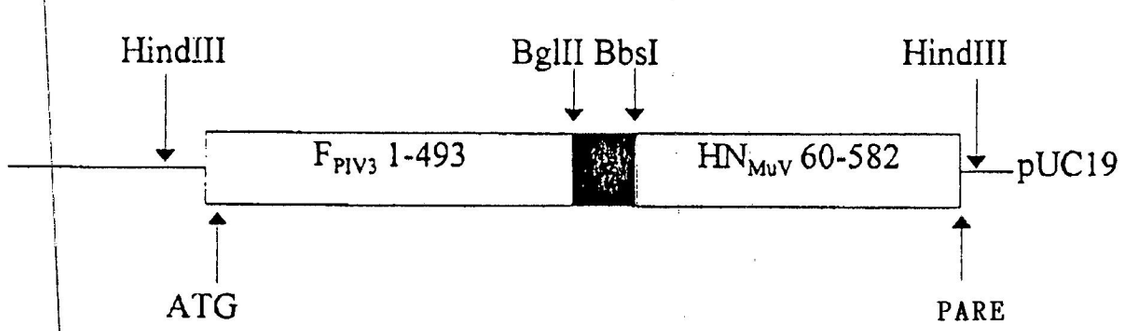
B) pEE14 $Fs^{+}a^{-}$ PIV3 x G $s^{-}a^{-}$ RSV



261
00265

Figura 13

A) pNIV4117



B) pEE14 $Fs^{+}a^{-}$ PIV3 x HN $s^{-}a^{-}$ MuV

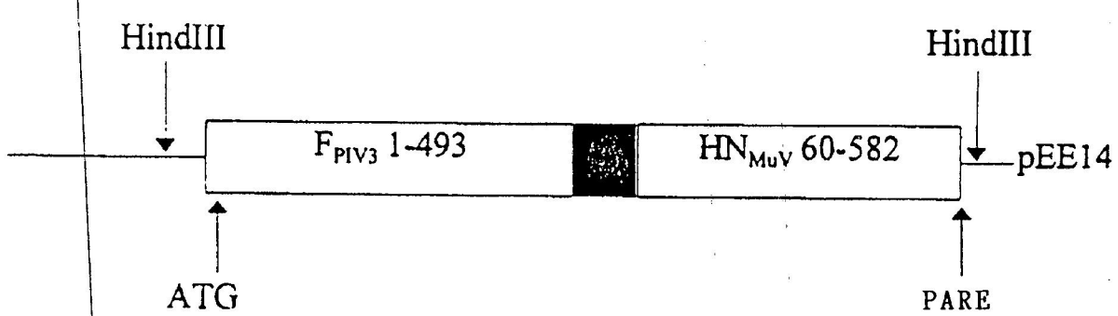
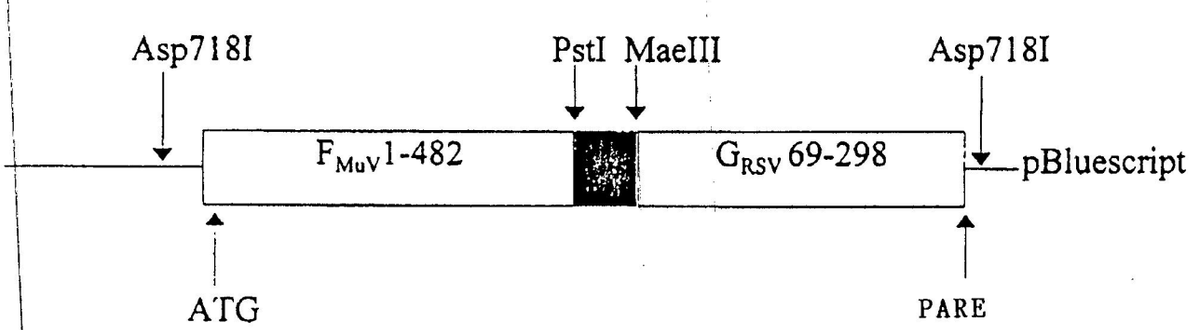


Figura 14

262
00266

A) pNIV4113



B) pEE14 $Fs^{+}a^{-}$ MuV x G $s^{-}a^{-}$ RSV

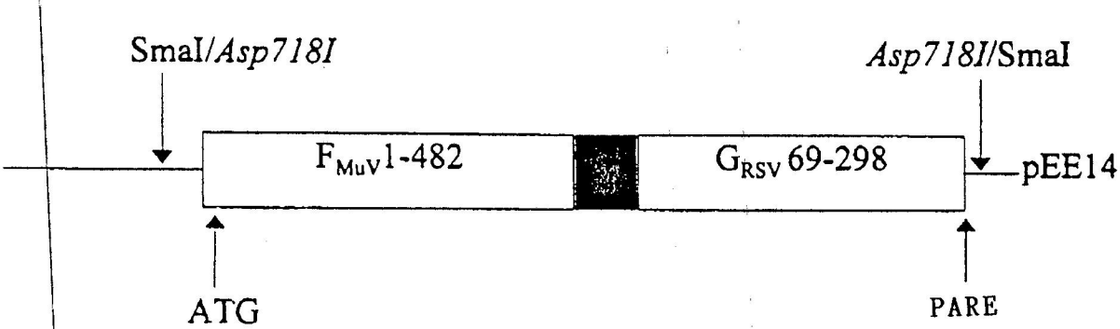
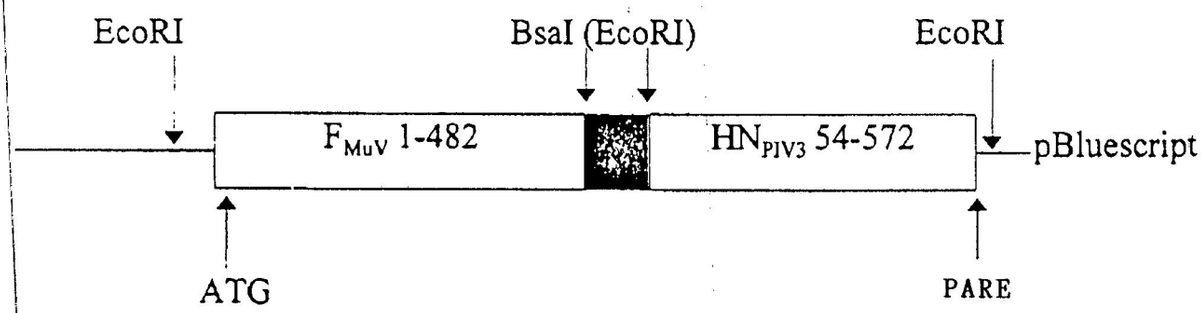


Figura 15

263

A) pNIV4115



B) pEE14 $Fs^{+}a^{-}$ MuV x $HNs^{-}a^{-}$ PIV3

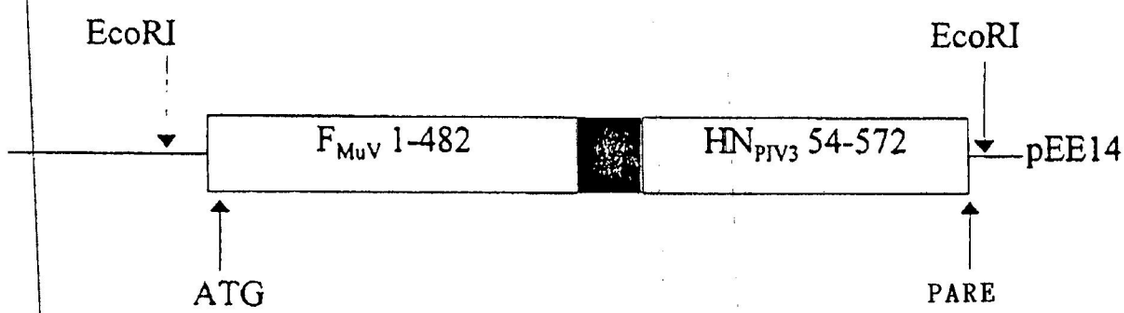
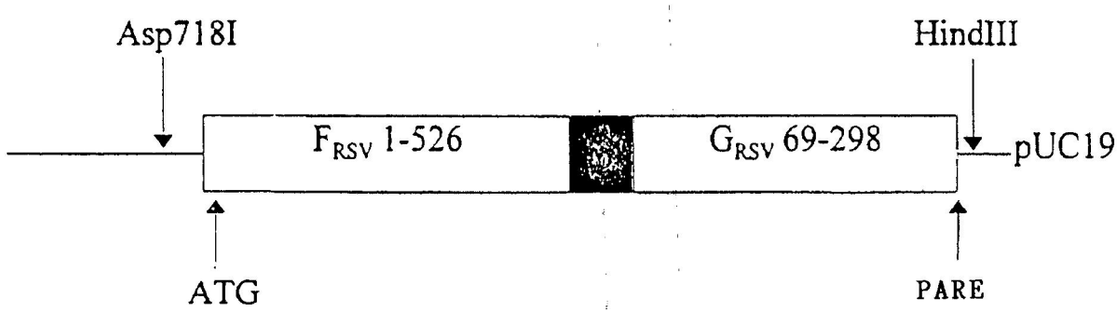


Figura 16

264
00268

A) pNIV2857



B) pNIV2870

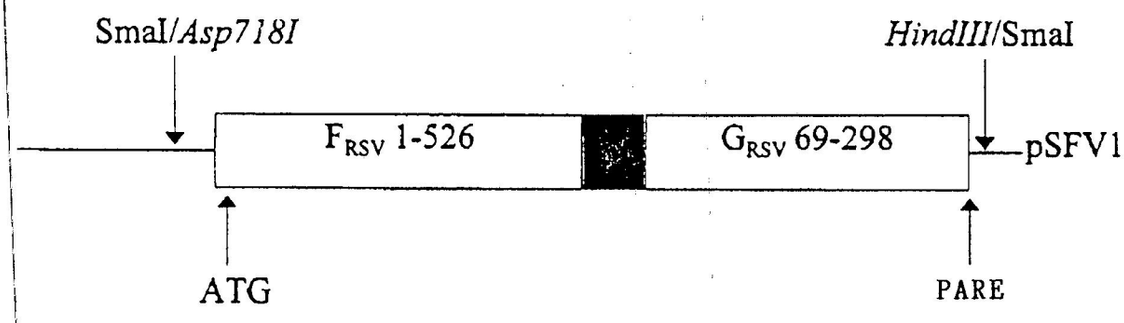
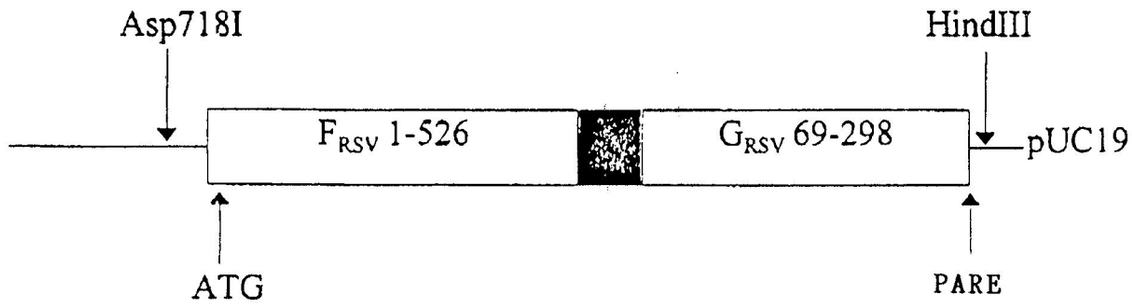


Figura 17

A) pNIV2857



B) pEE14 Fs⁺a⁻ RSV x G s⁻a⁻ RSV

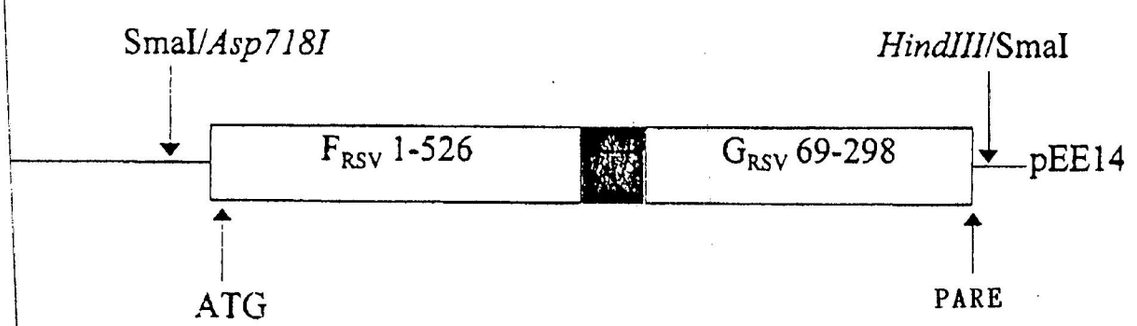


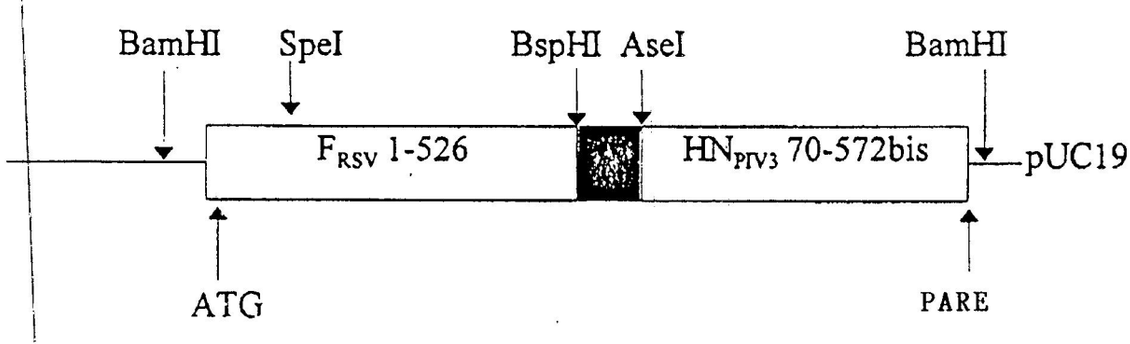
Figura 18

A) Adaptadores sintéticos

```
5' C ATG AAC AAT GAG TTT ATG GAA GTT ACA GAA AAG ATC CAA
       TTG TTA CTC AAA TAC CTT CAA TGT CTT TTC TAG GTT
BspHI

ATG GCA TCG GAT ATT AT 3'
TAC CGT AGC CTA TAA TAT A      [SEC ID NO: 7]
                    AseI
```

B) pNIV4120



C) pEE14 F s⁺ a⁻ RSV xHN s⁻a⁻ PiV3bis

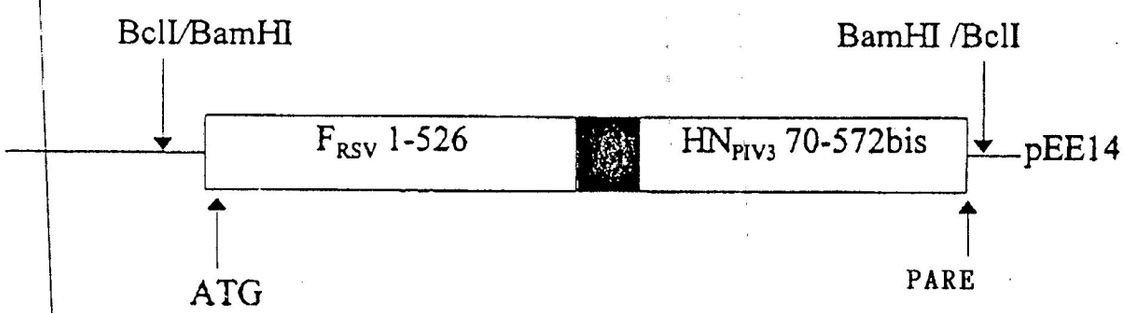


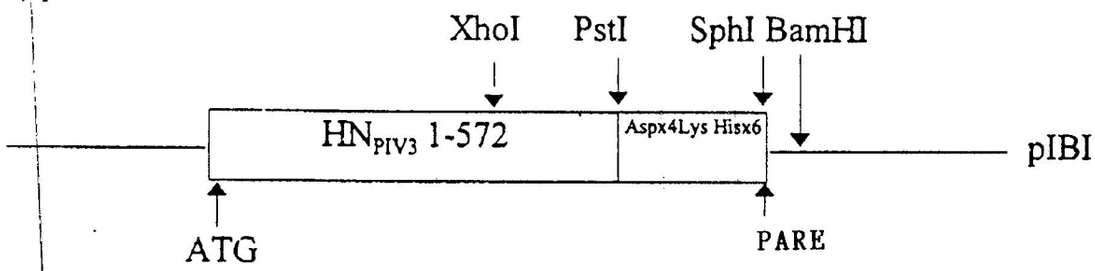
Figura 19

A) Adaptadores sintéticos

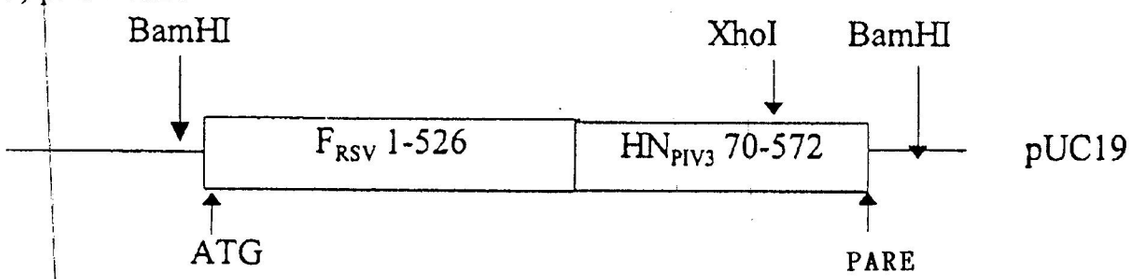
PstI 5'GT GAC GAT GAC GAT AAG CAT CAT CAT CAT CAT CAT TAG
ACGTC ACA CTG CTA CTG CTA TTC GTA GTA GTA GTA GTA GTA ATC

GGATCCGCATG 3'
CCTAGGC SphI [SEC ID NO: 8]

B) pNIV3340



C) pNIV4120



C) pEE14 F s$^+$ a$^-$ RSV xHN s$^-$a$^-$ PiV3 enthis

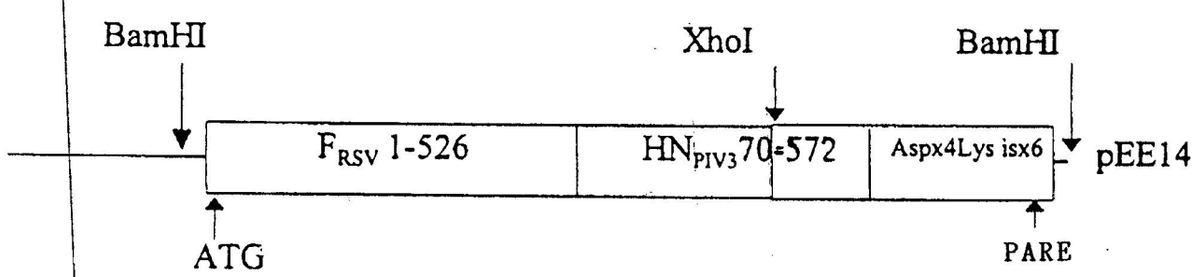
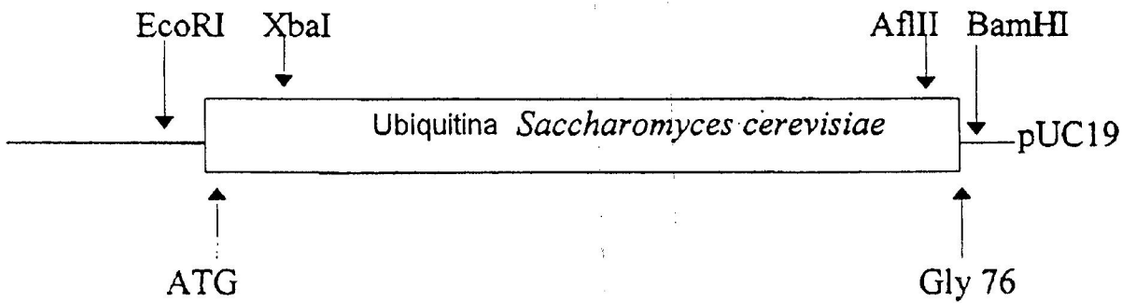


Figura 20

A) pNIV3475

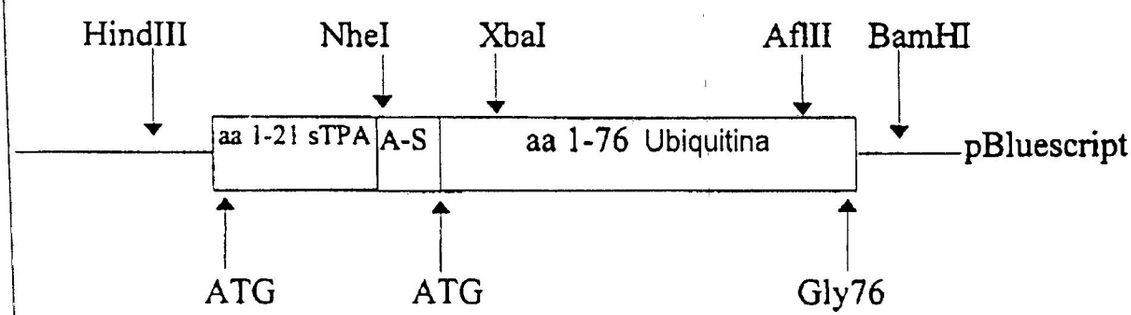


B) Adaptadores sintéticos

5' CT AGC ATG CAG ATC TTC GTC AAG ACG TTA ACC GGT AAA ACC
NheI G TAC GTC TAG AAG CAG TTC TGC AAT TGG CCA TTT TGG

ATA ACC 3' XbaI
TAT TGG ATCT [SEC ID NO: 9]

C) pNIV4122

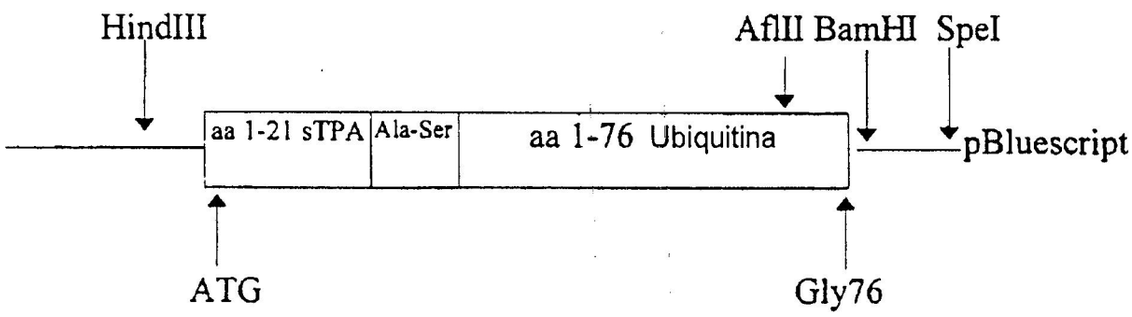


269

002/73

Figura 21

A) pNIV4122



B) Adaptadores sintéticos

5' TTA AGA CTA AGA GAC GAT GAC GAT AAG TCC AGT CAA AAC
AflII CT GAT TCT CTG CTA CTG CTA TTC AGG TCA GTT TTG

ATC ACT GAA GAA TTT TAT CAA TCA ACA TGC AGT GCA GTC AGC
TAG TGA CTT CTT AAA ATA GTT AGT TGT ACG TCA CGT CAG TCG

AAA GGC TAT CTT AGT GCT CTA AGA ACT GGT TGG TAT A 3' SpeI
TTT CCG ATA GTT TCT CGA GAT TCT TGA CCA ACC ATA TGA TC

[SEC ID NO: 10]

C) pNIV4123

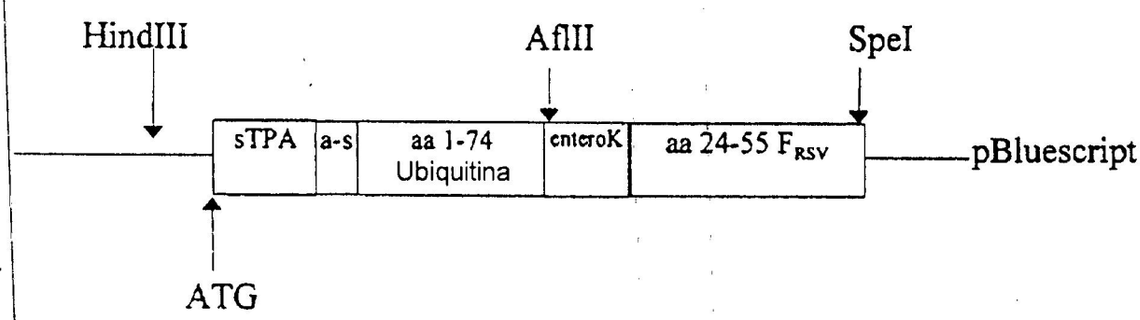
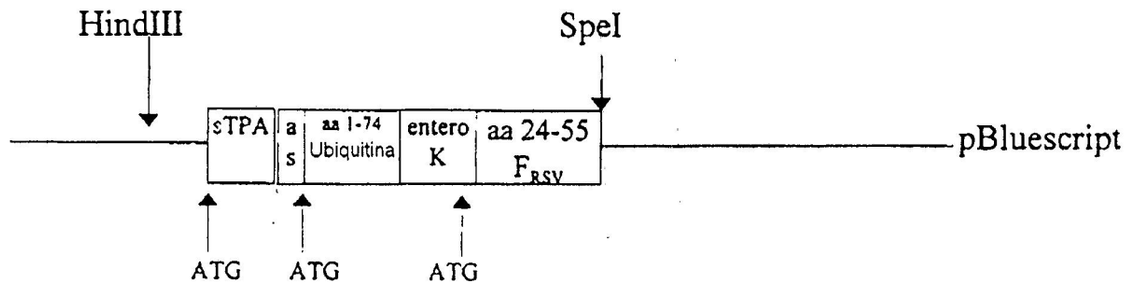
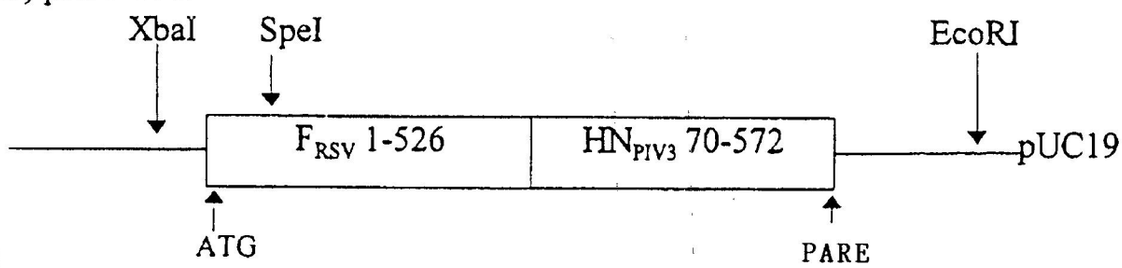


Figura 22

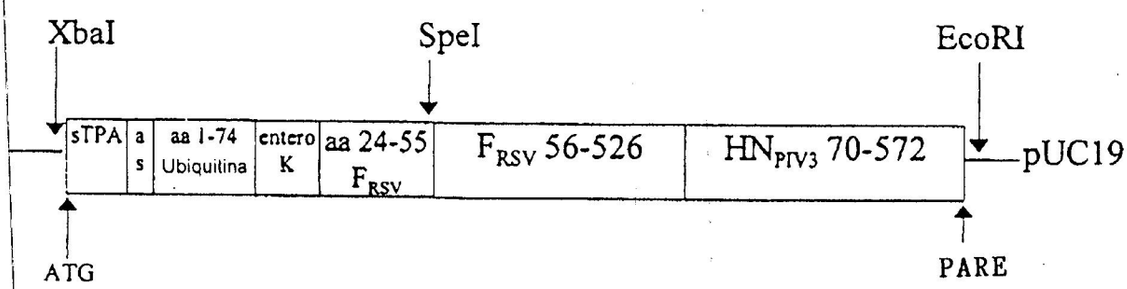
A) pNIV4123



B) pNIV4120



C) pNIV4124



D) pEE14 sTPA UBI EN Fs⁻a⁻ RSV x HN s⁻a⁻ PiV3

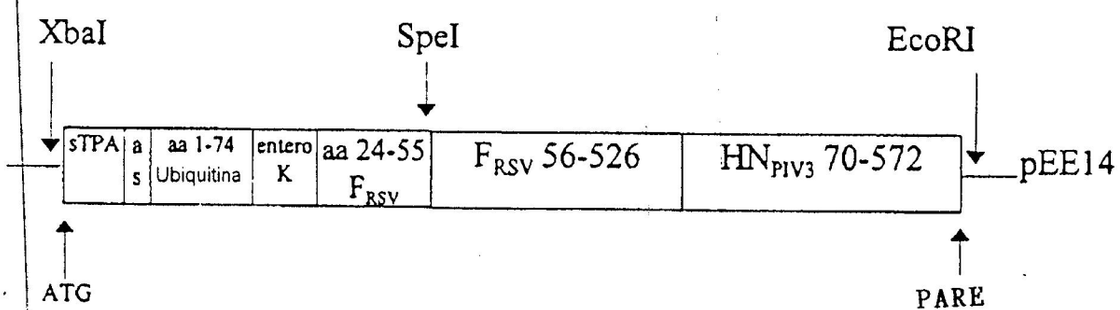
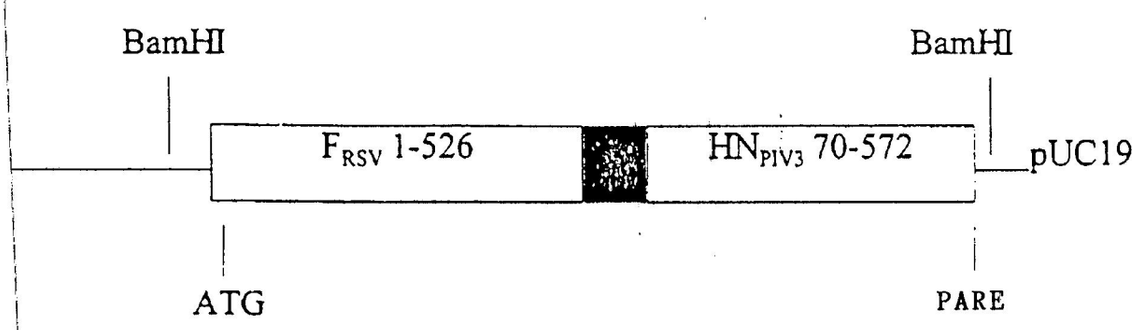
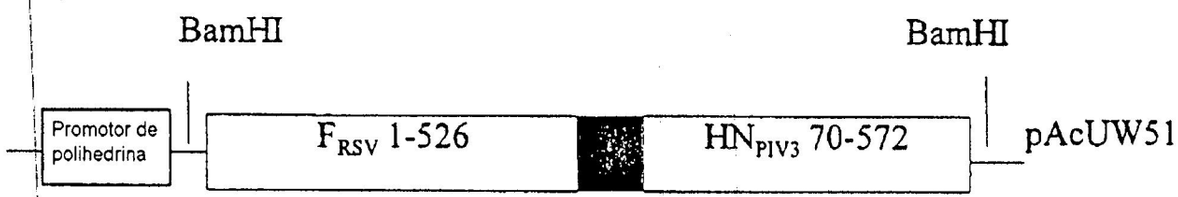


Figura 23

A) pNIV4120



B) pNIV4132

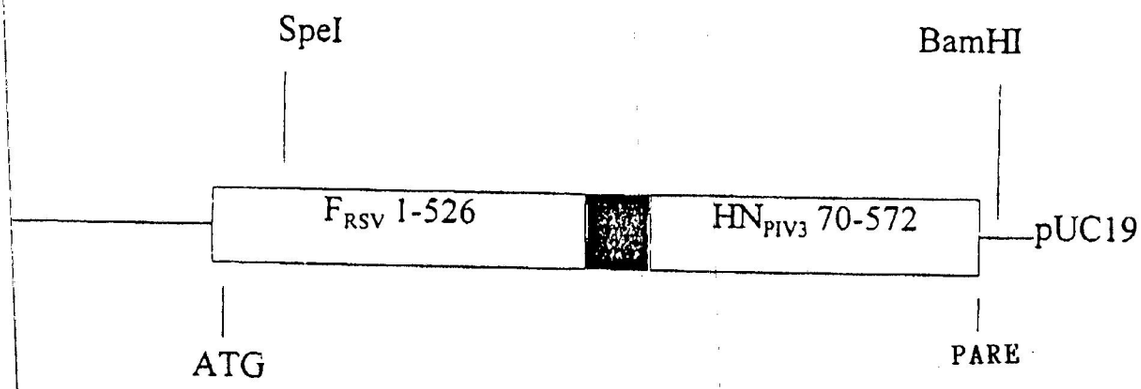


272

00276

Figura 24

A) pNIV4120



B) Adaptadores sintéticos

```
5' GAT CAA AAC ATC ACT GAA GAA TTT TAT CAA TCA ACA TGC
 BamHI TT TTG TAG TGA CTT CTT AAA ATA GTT AGT TGT ACG

AGT GCA GTC AGC AAA GGC TAT CTT AGT GCT CTA AGA ACT
TCA CGT CAG TCG TTT CCG ATA GAA TCA CGA GAT TCT TGA

GGT TGG TAT A 3' SpeI
CCA ACC ATA TGA TC  [SEC ID NO: 11]
```

C) pNIV4136

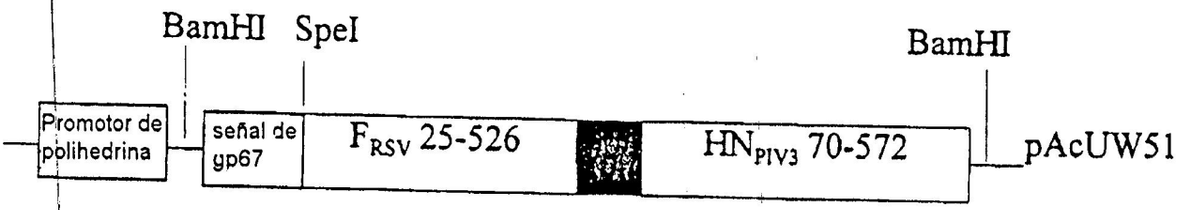


Fig 25: SDS-PAGE (condiciones reducidas) de la proteína $F_{RSV}HN_{PIV3}$ purificada por inmunoafinidad a partir del medio de cultivo gastado del baculovirus recombinante 3546.

kDa: marcador de peso molecular

A: tinción con azul de Coomassie
B: Transferencia de Western revelada por un suero 20 RG45 policlonal de cabra anti-RSV

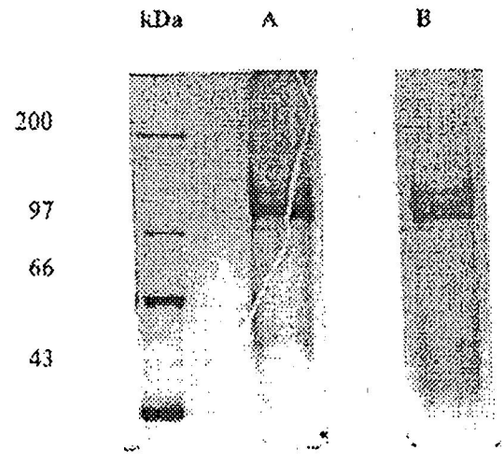


Figura 26: Uso de codones de $F_{RSV}HN_{PIV3}$ y genes humanos muy expresados (hum alta exp) que muestra las frecuencias (x 100) de los codones individuales para cada uno de los aminoácidos codificados degenerados, y el codón más prevalente en negritas.

		hum alta exp	$F_{RSV}HN_{PIV3}$
Ala	GCG	17	3
	A	13	**51**
	T	17	35
	C	**53**	11
Arg	AGG	18	28
	A	10	**56**
	CGG	21	0
	A	6	10
	T	7	5
	C	**37**	0
Asn	AAT	22	62
	C	**78**	38
Asp	GAT	25	66
	C	**75**	34
Cys	TGT	32	62
	C	**68**	38
Gln	CAG	88	32
	C	12	**68**
Glu	GAG	75	22
	A	25	**77**
Gly	GGG	24	22
	A	14	**37**
	T	12	22
	C	**50**	19
His	CAT	21	86
	C	79	14
Ile	ATA	5	49
	T	18	30
	C	**77**	20
Leu	TTG	6	10
	A	2	**39**
	CUG	**58**	6
	A	3	23
	T	5	11
	C	26	12
Lys	AAG	82	34
	A	18	**66**
Phe	TTT	20	63
	C	80	37
Pro	CCG	17	12
	A	16	**51**
	T	19	26
	C	**48**	12
Ser	AGT	10	21
	C	**34**	16
	TCG	9	7
	A	5	**27**
	T	13	17
	C	**28**	13
Thr	ACG	15	6
	A	14	**56**
	T	14	26
	C	**57**	12
Tyr	TAT	26	79
	C	74	21
Val	GTG	**64**	19
	A	5	**41**
	T	7	23
	C	25	17

Figura 27: Diagrama esquemático de la síntesis por PCR de cada fragmento, que muestra sitios de restricción únicos a lo largo de la secuencia (rayas negras) y los sitios de restricción (A y B) que permiten la recuperación del fragmento de tamaño completo del vector de clonación.

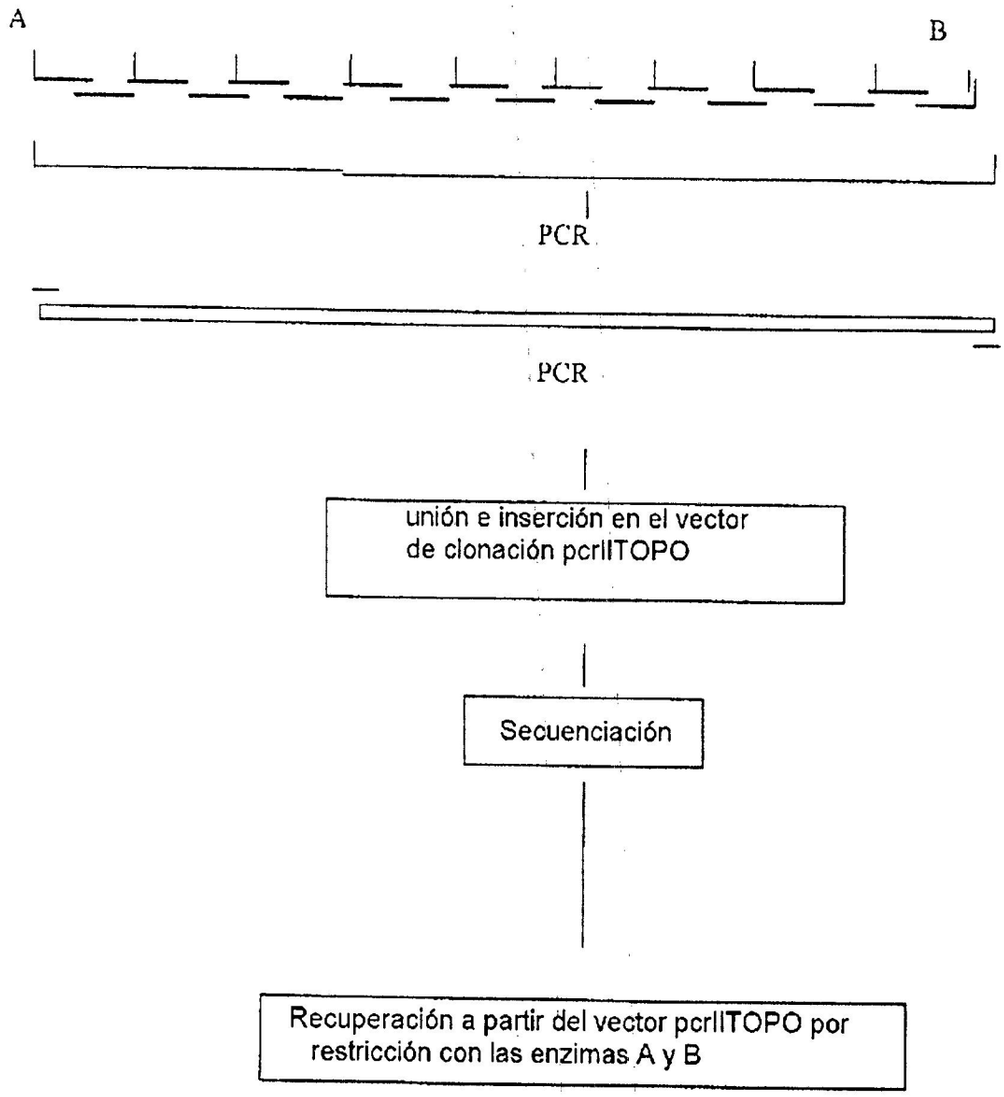


Figura 28: Secuencia de los 18 oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento A de PCR.

1) olfhum1.sec, bases 1-90 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, homóloga a ARNm
5'cccTCTAGAGGATCCACCATGGAGCTGCTGATtttaAAGACCAACGCCATCACCGCCATCCTG
GCCGCGGTGACCCTCTGCTTCGCGTCC

2) olfhum2.sec, bases 75-165 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'CCTCAGCGCGCTCAGGTAGCCCTTGCTGACAGCagaGCAGGTGGACTGGTAGAACTCCTCGGTG
ATGTTCTGGCTGGACGCGAAGCAGAGG

3) olfhum3.sec, bases 150-240 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, homóloga a ARNm
5'CCTGAGCGCGCTGAGGACGGGGTGGTACACtAGtGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAG
GAGAACAAGTGCAACGGCACCGACGCC

4) olfhum4.sec, bases 225-310 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'GCATCAGCAGCTGCAGCTCGGTCACGGCGCTCTTGTACTTGTCCAGCTCCTGCTTGATCAGCTT
CACCTTGGCGTCGGTGCCGTTG

5) olfhum5.sec, bases 295-397 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, homóloga a ARNm
5'CTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACagaGCCAGGCGCGAGCTGCCCAGGT
TCATGAACTACACCCTCAACAACACCAAGAACACCAACG

6) olfhum6.sec, bases 378-496 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, complementaria inversa a ARNm
GGTGCAGGACCTTGGACACCGCGATGCCGCTGGCGATGGCGGAGCCCACGCCCAGCAGGAAGCCCA
GGAAgCGccTCTTgCgCTTCTTGCTCAGGGTCACGTTGGTGTTCTTGGTGTTG

7) olfhum7.sec, bases 480-561 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, homóloga a ARNm
5'GTCCAAGGTCCTGCACCTGGAGGGGGAGGTGAACAAGATCAAGAGCGCCCTGCTCTCCACCAAC
AAGGCGGTGGTCAGCCTG

8) olfhum8.sec, bases 543-633 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'GGGGAGCAatTGCTTGTCGATGTAGTTCTTGAGGTCCAGCACCTTGCTGGTCAGCACGCTCACG
CCGTTGGACAGGCTGACCACCGCCTTG

9) olfhum9.sec, bases 609-676 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, homóloga a ARNm
5'CTACATCGACAAGCAatTGCTCCCCATCGTGAACAAGCAGtcCTGCAGCATCTCTAACATTGAG
ACCG

10) olfhum10.sec, bases 653-732 de $F_{RSV}HN_{P_iV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'GCTGAACTCCCTGGTGATCTCCAGCAGCCTGTTGTTCTTCTGCTGGAACTCGATCACGGTCTCA
ATGTTAGAGATGCTGC

11) olfhum11.sec, bases 714-787 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, homóloga a ARNm
5'GATCACCAGGGAGTTCAGCGTGAACGCgGGcGTcACCACCCCGGTGAGCACCTACATGCTGACC
AACAGCGAGC

12) olfhum12.sec, bases 768-846 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'GTTGGACATaAGCTTCTTCTGGTCGTTGGTGATGGGCATGTCGTTGATCAGGGACAGCAGCTCG
CTGTTGGTCAGCATG

13) olfhum13.sec, bases 825-916 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, homóloga a ARNm
5'CCAGAAGAAGCTtATGTCCAACAACGTGCAGATCGTGCGCCAGCAGAGCTACagCATCATGagC
ATCATCAAGGAGGAGGTGCTGGCCTACG

14) olfhum14.sec, bases 900-990 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'GGTGGTGCACAGGGGGGAGGTGTGCAGCTTCCAGCAGGGGGTGTCGATCACGCCGTACAGGGGC
AGCTGCACCACGTAGGCCAGCACCTCC

15) olfhum15.sec, bases 975-1065 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, homóloga a ARNm
5'CCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCTCCAACATCTGCCTGACCCGCACCGACCGGGGC
TGGTACTGCGACAACGCCGGCTCCGTG

16) olfhum16.sec, bases 1048-1133 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'CTGTTCATGGTGTCGCAGAACACGCGGTTGGACTGCACCTTGCAGGTCTCCGCCAGGGGGAAGA
AGGACACGGAGCCGGCGTTGTC

17) olfhum17.sec, bases 1116-1210 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, homóloga a ARNm
5'CTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCAGCGAGGTGAACCTCTGCAACATCGACATCTTC
AACCCCAAGTACGACTGCAAGATtATGacctcc

18) olfhum18.sec, bases 1195-1295 de $F_{RSV}HN_{PiV3}$, complementaria inversa a ARNm
gggaattctgtacacttggtcttgccgtagcaggacacgatggcgcccagggaggtgatcacggag
ctgctcacgtcggtcttggaggtCATaATCTTGCAG

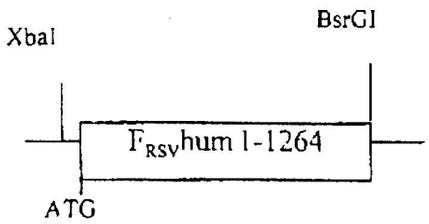
[LAS SECUENCIAS ANTERIORES SON LAS SEC ID NOs: 12 a 29, respectivamente]

278 J14

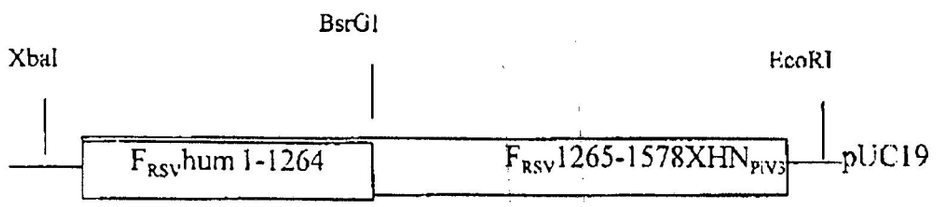
00282

Figura 29: Construcción de pEE14 F_{RSV}humHN$_{PiV3}$

a) Fragmento A de PCR



b) pNIV4120 + Fragmento A de PCR



c) pEE14 F_{RSV}hum HN$_{PiV3}$

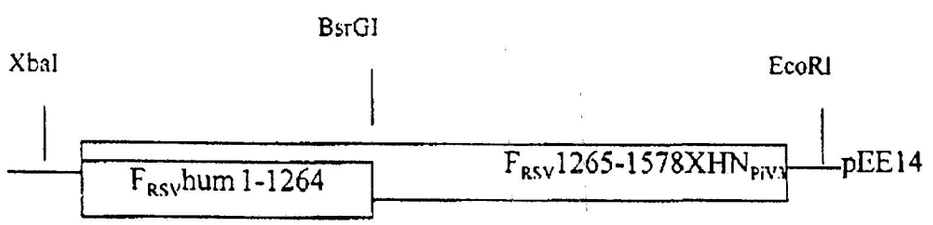


Fig 30: Secuencia de los 10 oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento B de PCR

1) olfhnhum19.sec, bases 1269-1353 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, homóloga a ARNm
5'cggcaagaccaagtgtacagcctccaacaagaaccgcggcatcatcaagaccttctccaacgg
ctgcgactacgtgtccaacaag 3'

2)olfhnhum20.sec, bases 1336-1428 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, complementaria inversa de ARNm
5'cttcacgtacaggctcttgcccctcctgcttgttcacgtagtacagggtgttgcccacggacac
ggtgtccacgcccttgttggacacgtagtc 3'

3)olfhnhum21.sec, bases 1413-1497 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, homóloga a ARNm
5'gagcctgtacgtgaagggcgagcccatcatcaacttctacgacccgctggtgttccccctccga
cgagttcgacgcctccatctccc 3'

4)olfhnhum22.sec, bases1483-1599 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, complementaria inversa a ARNm
5'gttcatgatgttggtggtggacttgccggcgttcacgttgtgcagcagctcgtcggacttgcg
gatgaaggccaggctctggttgatcttctcgttcacctgggagatggaggcgtc 3'

5)olfhnhum23.sec, bases 1581-1691 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, homóloga a ARNm
5'caccaccaacatcatgaacaacgagttcatggaggtgaccgagaagatccagatggcctccga
caacatcaacgacctgatccagtccggcgtgaacacccggctgctgac 3'

6)olfhnhum24.sec, bases 1677-1779 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, inversa complementaria de ARNm
5'gatggtgatctcgctgatgaacttccgcaggtcggacatctgctgggtcagggagatggggat
gtagttctgcacgtggcttctggatggtcagcagccgggtg 3'

7)olfhnhum25.sec, bases 1761-1865 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, homóloga a ARNm
5'catcagcgagatcaccatccggaacgacaaccaggaggtgccccccccagaggatcacccacga
cgtgggcataaagcccctgaaccccgacgacttctggcgctg 3'

8)olfhnhum26.sec, bases 1849-1967 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, complementaria inversa de ARNm
5'gtgcgcacgcagccgtccacggtggtgggcatggccagcaggccgggcccgggcatcagcctt
atcttgggggtcttcatcagggaggggaggccggaggtgcagcgccagaagtcgtc 3'

9)olfhnhum27.sec, bases 1953-2059 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, homóloga a ARNm
5'cggctgcgtgcgcacccccctccctggtgatcaacgacctgatctacgcctacacctccaacct
gatcacccgcggctgccaggacatcggcaagtcctaccaggtgc 3'

10)olfhnhum28.sec, bases 2043-2154 de $F_{RSV}HN_{PIV3}$, complementaria inversa de ARNm
5'ggacttcctgttgtcgttgatgttgaaggtgtgggagatccgggggttcaggtcgggcaccag
gtcggagttcacggtgatgatgccgatctgcagcacctggtaggacttg

[LAS SECUENCIAS ANTERIORES SON LAS SEC ID NOs: 30-39, respectivamente]

Fig 31: Secuencia de los 16 oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento C de PCR

1) olfhnhum29.sec, bases 2139-2229 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5'cgacaacaggaagtcctgctcgctggccctcctgaacaccgacgtgtaccagctgtgctccac
gcccaacgtggacgagcgctccgactac 3'

2) olfhnhum30.sec, bases 2214-2307 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, complementaria inversa a ARNm
5'gttcttgaagcgggtggtggagatggagccgtcgtggttcacgatgtccagcacgatgtcctc
gatgccggagctggcgtagtcggagcgctcg 3'

3) olfhnhum31.sec, bases 2292-2398 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5'cacccgcttcaagaacaacaacatcagcttcgaccagccctacgccgccctgtaccccctccgt
gggccccggcatcgactacaagggcaagatcatcttcctgggc 3'

4) olfhnhum32.sec, bases 2382-2472 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, complementaria inversa a ARNm
5'ccgctgggtcttgccggggcaccccggtggtgttgcagatggcgttcccgttgatggggtgctc
caggccgccgtagcccaggaagatgatc 3'

5) olfhnhum33.seq, bases 2457-2549 of $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5'cggcaagacccagcgggactgcaaccaggccgcccacagccccctggttctccgaccgccgcat
ggtgaactccatcatcgtggtggacaaggg 3'

6) olfhnhum34.seq, bases 2532-2643 of $F_{RSV}HN_{Piv3}$, complementaria inversa a ARNm
5'cttgttgcccagcagcagcaggcggccctcggagccccagtagttctgccgcatggagatggt
ccacaccttcagcttggggatggagttcaggcccttgtccaccacgatg 3'

7) olfhnhum35.seq, bases 2628-2726 of $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5'gctgctgggcaacaagatctacatctacacccgctccaccagctggcacagcaagctgcagct
gggcatcatcgacatcaccgactacagcgacatccg 3'

8) olfhnhum36.seq, bases 2710-2781 of $F_{RSV}HN_{Piv3}$, complementaria inversa a ARNm
5'ggggcactcgttgttgccgggccggctcagcacgttgtgccaggtccacttgatgcggatgtc
gctgtagtc 3'

9) olfhnhum37.seq, bases 2765-2836 of $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5'gcaacaacgagtgcccctggggccactcctgccccgacggctgcatcaccggcgtgtacaccg
acgcctacc 3'

10) olfhnhum38.seq, bases 2820-2889 of $F_{RSV}HN_{Piv3}$, complementaria inversa a ARNm
5'cttctgggagtccaggatcacggagctcacgatgctgccggtggggttcaggggtaggcgtc
ggtgtac

11) olfhnhum39.sec, bases 2874-2943 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5' cctggactcccagaagtcccgggtgaaccccgtgatcacctacagcacctccaccgagcgcgt
gaacgag

12) olfhnhum40.sec, bases 2927-2994 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$ de: 1 a: 68, complementaria inversa a ARNm
5' gcagctggtggtggtgtagccggcgctcagggtcttgttgcggatggccagctcgttcacgcg
ctcgg

13) olfhnhum41.sec, bases 2979-3043 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5' caccaccaccagctgcatcacccactacaacaagggctactgcttccacatcgtggagatcaa
cc

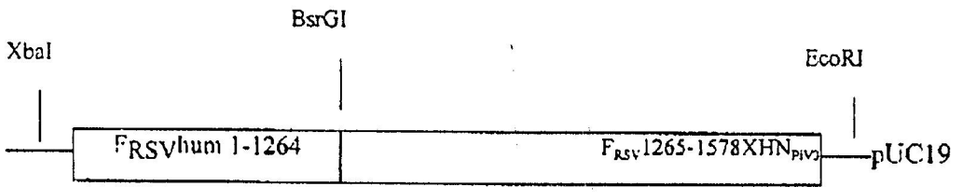
14) olfhnhum42.sec, bases 3027-3085 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, complementaria inversa a ARNm
5' cggtcttgaacagcatgggctggaaggtgtccaggctcttgtggttgatctccacgatg 3'

15) olfhnhum43.sec, bases 3069-3114 de $F_{RSV}HN_{Piv3}$, homóloga a ARNm
5' catgctgttcaagaccgagatccccaagagctgcagctaaGAATTC 3'

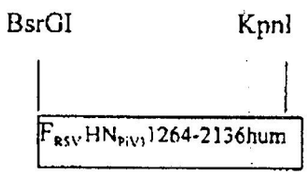
[LAS SECUENCIAS ANTERIORES SON SEC ID NOs: 40-54, respectivamente]

Figura 32: Construcción de pEE14F_{RSV}hum HN_{PIV}hum

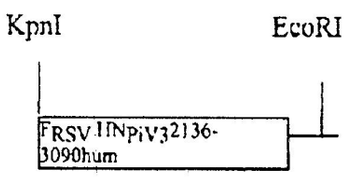
a) pNIV4120 + fragmento A de PCR



b) fragmento B de PCR



c) fragmento C de PCR



d) pEE14 F_{RSV}hum HN_{PIV3}hum

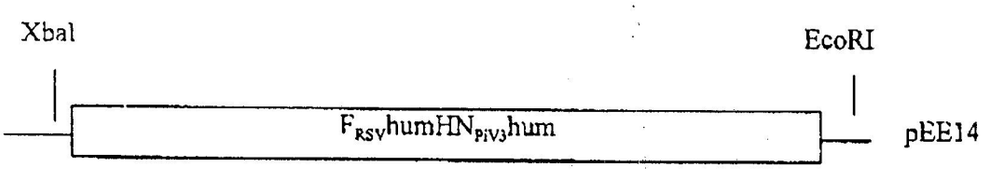


Figura 33A: Secuencia de ácidos nucleicos humanizados de $F_{RSV}HN_{PIV3}$ (secuencia superior) en comparación con la secuencia original encontrada en el pNIV4120

```
   7 AGAGGATCC.......ACCATGGAGCTGCTGATtttaAAGACCAACGCCA 49
     |||||||||       ||||| |'| |'|| ||  | || |' || || |
2262 AGAGGATCCCCCGGGTAccatggagttgctaatcctcaaaacaaatgcaa 2311

  50 TCACCGCCATCCTGGCCGCGGTGACCCTCTGCTTCGCGTCCAGCCAGAAC 99
     | |||| ||||| || |' || || ||||| || || '|||| || |||
2312 ttaccgcaatccttgctgcagtcacactctgttttgcttccagtcaaaac 2361

 100 ATCACCGAGGAGTTCTACCAGTCCACCTGCtctGCTGTCAGCAAGGGCTA 149
     |'||| || || || || || || || |||  |'| |||||||| ||||'|
2362 atcactgaagaattttatcaatcaacatgcagtgcagtcagcaaaggctta 2411

 150 CCTGAGCGCGCTGAGGACGGGGTGGTACACtAGtGTGATCACCATCGAGC 199
      || || || || || || || ||||| |||||||| || || || ||
2412 tcttagtgctctaagaactggttggtatactagtgttataactatagaat 2461

 200 TGAGCAACATCAAGGAGAACAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTGAAG 249
     | |, |' |||||||| || ,|'|| || || || ||||| |'||| ||
2462 taagtaatatcaaggaaaataagtgtaatggaacagacgctaaggtaaaa 2511

 250 CTGATCAAGCAGGAGCTGGACAAGTACAAGAGCGCCGTGACCGAGCTGCA 299
      '||| ||  | ||  | || || || || || || || || ||  ||||
2512 ttgataaaacaagaattagataaatataaaagtgctgtaacagaattgca 2561

 300 GCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACagaGCCAGGCGCGAGC 349
     | |||| ||||| ||||| || | ,|'|||||  |||||||  | || |
2562 gttgctcatgcaaagcacaccggcaaccaacaatcgagccagaagagaac 2611

 350 TGCCCAGGTTCATGAACTACACCCTCAACAACACCAAGAACACCAACGTG 399
     | || ||||| ||||| || || |||||||| ||||| || ||||| ||
2612 taccaaggtttatgaattatacactcaacaataccaaaaataccaatgta 2661

 400 ACCCTGAGCAAGAAGcGcAAGaggCGcTTCCTGGGCTTCCTGCTGGGCGT 449
     ||  | |,|||||  | || ||  ' || || ||||  || | || ||
2662 acattaagcaagaaaagcaaaagaagatttcttggctttttgttaggtgt 2711

 450 GGGCTCCGCCATCGCCAGCGGCATCGCGGTGTCCAAGGTCCTGCACCTGG 499
      || || || ||||'||' ||||| || || || ,||||||||||||, |
2712 tggatctgcaatcgccagtggcattgctgtatctaaggtcctgcacctag 2761

 500 AGGGGGAGGTGAACAAGATCAAGAGCGCCCTGCTCTCCACCAACAAGGCG 549
     | ||||| || ||||| ||||| |  || || || ||||| ||||||||
2762 aaggggaagtgaacaaaatcaaaagtgctctactatccacaaacaaggct 2811
```

```
 550 GTGGTCAGCCTGTCCAACGGCGTGAGCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGA 599
     || |||||| | || || || || || ||  | |||||||| ||| | ||
2812 gtagtcagcttatcaaatggagttagtgtcttaaccagcaaagtgttaga 2861

 600 CCTCAAGAACTACATCGACAAGCAatTGCTCCCCATCGTGAACAAGCAGt 649
     |||||| ||||| || || || || ||| | || || ||||||||||
2862 cctcaaaaactatatagataaacagttgttacctattgtgaacaagcaaa 2911

 650 cCTGCAGCATCTCTAACATTGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAAC 699
      ||| ||||| || |||||||| || ||||| |||||||| || ||||||
2912 gctgtagcatatcaaacattgaaactgtgatagagttccaacaaaagaac 2961

 700 AACAGGCTGCTGGAGATCACCAGGGAGTTCAGCGTGAACGCgGGcGTcAC 749
     ||||| || || ||||| |||||||| || || || || || || || ||
2962 aacagactactagagattaccagggaatttagtgttaatgcaggtgtaac 3011

 750 CACCCCGGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGTCCCTGA 799
      || || || ||||| || ||| | || || || ||  |  | ||  | |
3012 tacacctgtaagcacttatatgttaacaaatagtgaattattatcattaa 3061

 800 TCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAGAAGCTtATGTCCAACAAC 849
     |||| || ||||| || || || || ||||| ||| | ||||||||||
3062 tcaatgatatgcctataacaaatgatcagaaaaagttaatgtccaacaat 3111

 850 GTGCAGATCGTGCGCCAGCAGAGCTACagCATCATGagCATCATCAAGGA 899
     || || || ||  | ||||| || |||   ||||||  ||| || |||||
3112 gttcaaatagttagacagcaaagttactctatcatgtccataataaagga 3161


900 GGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCCCTGTACGGCGTGATCGACA 949
     ||| ||  | || || || || ||  | || || || || || || || |
3162 ggaagtcttagcatatgtagtacaattaccactatatggtgtaatagata 3211

 950 CCCCCTGCTGGAAGCTGCACACCTCCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAG 999
     | || || ||||| |||||||| ||||| || || || |||||||| |||
3212 caccttgttggaaactgcacacatcccctctatgtacaaccaacacaaag 3261

1000 GAGGGCTCCAACATCTGCCTGACCCGCACCGACCGGGGCTGGTACTGCGA 1049
     || || ||||||||||||  | ||  | |||||| | || |||||||| ||
3262 gaagggtccaacatctgtttaacaagaaccgacagaggatggtactgtga 3311

1050 CAACGCCGGCTCCGTGTCCTTCTTCCCCCTGGCGGAGACCTGCAAGGTGC 1099
     ||| || || || || || |||||||| || || || || || || || |
3312 caatgcaggatcagtatctttcttcccactagctgaaacatgtaaagttc 3361

1100 AGTCCAACCGCGTGTTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCAGC 1149
     | || || || || || || ||||| ||||||||  | ||  | || ||
```

```
3362 aatcgaatcgagtattttgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagt 3411
1150 GAGGTGAACCTCTGCAACATCGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAA 1199
3412 gaagtaaatctctgcaacattgacatattcaaccccaaatatgattgcaa 3461
1200 GATtATGacctccaagaccgacgtgagcagctccgtgatcacctccctgg 1249
3462 aattatgacttcaaaaacagatgtaagcagctccgttatcacatctctag 3511
1250 gcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgtacagcctccaacaag 1299
3512 gagccattgtgtcatgctatggcaaaactaaatgtacagcatccaataaa 3561
1300 aaccgcggcatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaa 1349
3562 aatcgtggaatcataaagacattttctaacgggtgtgattatgtatcaaa 3611
1350 caagggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacaccctgtactacgtgaaca 1399
3612 taaggggtggacactgtgtctgtaggtaatacattatattatgtaaata 3661
1400 agcaggagggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcccatcatcaacttc 1449
3662 agcaagaaggcaaaagtctctatgtaaaaggtgaaccaataataaatttc 3711
1450 tacgacccgctggtgttcccctccgacgagttcgacgcctccatctccca 1499
3712 tatgacccattagtgttcccctctgatgaatttgatgcatcaatatctca 3761
1500 ggtgaacgagaagatcaaccagagcctggccttcatccgcaagtccgacg 1549
3762 agtcaatgagaagattaaccagagcctagcatttattcgtaaatccgatg 3811
1550 agctgctgcacaacgtgaacgccggcaagtccaccaccaacatcatgaac 1599
3812 aattattacataatgtaaatgctggtaaatccaccacaaatatcatgAAC 3861
1600 aacgagttcatggaggtgaccgagaagatccagatggcctccgacaacat 1649
3862 AATGAGTTTATGGAAGTTACAGAAAAGATCCAAATGGCATCGGATAATAT 3911
1650 caacgacctgatccagtccggcgtgaacacccggctgctgaccatccaga 1699
3912 TAATGATCTAATACAGTCAGGAGTGAATACAAGGCTTCTTACAATTCAGA 3961
```

286 +22
00250

```
1700 gccacgtgcagaactacatccccatctccctgacccagcagatgtccgac 1749
     |  ||  ||  |||||  ||  ||  ||  ||  ||   ||||  ||  ||  |||||  ||
3962 GTCATGTCCAGAATTATATACCaATATCATTGACACAACAAATGTCGGAT 4011

1750 ctgcggaagttcatcagcgagatcaccatccggaacgacaaccaggaggt 1799
     ||   ||||  |||||  ||  ||  ||  ||  ||   ||||  ||  ||  ||  ||  ||
4012 CTTAGGAAATTCATTAGTGAAATTACAATTAGGAATGATAATCAAGAAGT 4061

1800 gccccccagaggatcacccacgacgtgggcataaagcccctgaaccccg 1849
     |||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||||||||||||  ||   |  ||  ||  |
4062 GCCTCCACAAAGAATAACACATGATGTGGGCATAAAACCTTTAAATCCAG 4111

1850 acgacttctggcgctgcacctccggcctcccctccctgatgaagacccccc 1899
     |  ||  ||  |||  |  |||||  ||  ||  ||  ||  ||   |  |||||  ||  ||
4112 ATGATTTTTGGAGATGCACGTCTGGTCTTCCATCTTTAATGAAAACTCCA 4161

1900 aagataaggctgatgcccgggcccggcctgctggccatgcccaccaccgt 1949
     ||  ||||||  |  |||||  |||||  ||   |   |  ||  |||||  ||  ||  ||
4162 AAAATAAGGTTAATGCCGGGGCCGGGATTATTAGCTATGCCAACGACTGT 4211

1950 ggacggctgcgtgcgcacccccctccctggtgatcaacgacctgatctacg 1999
      ||  |||||  ||   |  ||  ||  |||  |  ||  ||  ||  ||  |||||  ||  |
4212 TGATGGCTGTGTTAGAACTCCGTCCTTAGTTATAAATGATCTGATTTATG 4261

2000 cctacacctccaacctgatcacccgcggctgccaggacatcggcaagtcc 2049
     |  ||  |||||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||||||||  ||  ||  ||  ||
4262 CTTATACCTCGAATCTAATTACTCGAGGTTGCCAGGATATAGGAAAATCA 4311

2050 taccaggtgctgcagatcggcatcatcaccgtgaactccgacctggtacc 2099
     ||  ||  ||   |  |||||  ||  ||  ||  ||  ||  |||||  |||  |||||||
4312 TATCAAGTATTACAGATAGGGATAATAACTGTAAACTCAGACTTGGTACC 4361

2100 cgacctgaacccccggatctcccacaccttcaacatcaacgacaacagga 2149
      |||  |  ||  ||   |||||||  ||  ||  ||||||||  ||  |||||  ||  |
4362 TGACTTAAATCCTAGGATCTCTCATACTTTCAACATAAATGACAATAGAA 4411

2150 agtcctgctccctggccctcctgaacaccgacgtgtaccagctgtgctcc 2199
     ||||  ||  ||  ||  ||  |||||  |||||  ||  ||  ||  ||  |||||  ||
4412 AGTCATGTTCTCTAGCACTCCTAAACACAGATGTATATCAACTGTGTTCG 4461

2200 acgcccaaggtggacgagcgctccgactacgccagctccggcatcgagga 2249
     ||  |||||  ||  ||  ||   |  ||  ||  ||  ||    ||  |||||  ||  ||
4462 ACTCCCAAAGTTGATGAAAGATCAGATTATGCATCATCAGGCATAGAAGA 4511

2250 catcgtgctggacatcgtcaaccacgacggctccatctccaccacccgct 2299
      ||  ||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||   |  |
4512 TATTGTACTTGATATtGTCAATCATGATGGTTCAATCTCAACAACAAGAT 4561
```

227
00291

```
2300 tcaagaacaacaacatcagcttcgaccagccctacgccgccctgtacccc 2349
     | ||||||||| || || || || || || || || || ||   | |||||
4562 TTAAGAACAATAATATAAGTTTTGATCAACCATATGCGGCATTATACCCA 4611

2350 tccgtgggccccggcatctactacaagggcaagatcatcttcctgggcta 2399
     || || || || || || |||||||| ||||| || || || || || ||
4612 TCTGTTGGACCAGGGATATACTACAAAGGCAAAATAATATTTCTCGGGTA 4661

2400 cggcggcctggagcaccccatcaacgagaacgccatctgcaacaccaccg 2449
      || || || || || || || || ||||| || ||||||||||| || |
4662 TGGAGGTCTTGAACATCCAATAAATGAGAATGCAATCTGCAACACAACTG 4711

2450 ggtgccccggcaagacccagcgggactgcaaccaggcctcccacagcccc 2499
     |||| ||||| || || ||| | |||||||| ||||| || || || ||
4712 GGTGTCCCGGGAAAACGCAGAGAGACTGCAATCAGGCATCTCATAGTCCT 4761

2500 tggttctccgaccgccgcatggtgaactccatcatcgtggtggacaaggg 2549
     ||||| || ||| |  | ||||| |||||||| || || || ||||||||
4762 TGGTTTTCAGACAGAAGGATGGTCAACTCCATTATTGTTGTTGACAAGGG 4811

2550 cctgaactccatccccaagctgaaggtgtggaccatctccatgcggcaga 2599
     | | ||||| || || || |||||||| ||||| || |||||| | || |
4812 CTTAAACTCAATTCCAAAACTGAAGGTATGGACGATATCCATGAGACAAA 4861

2600 actactggggctccgagggccgcctgctgctgctgggcaacaagatctac 2649
     | |||||||| || || ||  | || || || || || ||||||||||||
4862 ATTACTGGGGGTCAGAAGGAAGGCTACTTCTACTAGGTAACAAGATCTAT 4911

2650 atctacacccgctccaccagctggcacagcaagctgcagctgggcatcat 2699
     || || ||  | || || || ||||| |||||| | ||  | || || ||
4912 ATATATACAAGATCTACAAGTTGGCATAGCAAGTTACAATTAGGAATAAT 4961

2700 cgacatcaccgactacagcgacatccgcatcaagtggacctggcacaacg 2749
      || || || || ||||| || ||  | || || ||||| ||||| || |
4962 TGATATTACTGATTACAGTGATATAAGAATAAAATGGACATGGCATAATG 5011

2750 tgctgagccggcccggcaacaacgagtgcccctggggccactcctgcccc 2799
     ||||     | || || ||||| || || || ||||| || || |||||
5012 TGCTATCAAGACCAGGAAACAATGAATGTCCATGGGGACATTCATGCCCA 5061

2800 gacggctgcatcaccggcgtgtacaccgacgcctacccccctgaaccccac 2849
     || || || || || || || || || || || || || || || || |||||
5062 GATGGATGTATAACAGGAGTATATACTGATGCATATCCACTCAATCCCAC 5111

2850 cggcagcatcgtgagctccgtgatcctggactcccagaagtcccgggtga 2899
      || ||||| |||   || || ||  | ||||| || || ||  | || |
5112 AGGGAGCATTGTGTCATCTGTCATATTAGACTCGCAAAAATCGAGAGTAA 5161
```

288
60292

```
2900 accccgtgatcacctacagcacctccaccgagcgcgtgaacgagctggcc 2949
     |||| || || || |||   || || || ||  | || ||||||||||||
5162 ACCCAGTCATAACTTACTCAACATCAACTGAAAGGGTAAACGAGCTGGCC 5211

2950 atccgcaacaagaccctgagcgccggctacaccaccaccagctgcatcac 2999
     ||||| ||||| || ||    || || || || || || ||||||||| ||
5212 ATCCGAAACAAAACACTCTCAGCTGGATATACAACAACGAGCTGCATTAC 5261

3000 ccactacaacaagggctactgcttccacatcgtggagatcaaccacaaga 3049
      ||||| ||||| || || || || || || || || || || || || | |
5262 ACACTATAACAAAGGATATTGTTTTCATATAGTAGAAATAAATCATAAAA 5311

3050 gcctggacaccttccagcccatgctgttcaagaccgagatccccaagagc 3099
     || | ||||| ||||| || ||| ||||||| || ||||| || || |||
5312 GCTTAGACACATTCCAACCTATGTTGTTCAAAACAGAGATTCCAAAAAGC 5361

3100 tgcagctaaGAAT 3112
     ||||| |||  ||
5362 TGCAGTTAATCAT 5374
```

289 PCT
00293

Figura 33B

MAPA (lineal) de: FrsvHNpiv3.sec comprobación: 7448 secuencia de ácidos nucleicos desde: 1 a:3090 de FrsvHNpiv3 (no humanizada)

atggagttgctaatcctcaaaacaaatgcaattaccgcaatccttgctgc

agtcacactctgttttgcttccagtcaaaacatcactgaagaattttatc

aatcaacatgcagtgcagtcagcaaaggctatcttagtgctctaagaact

ggttggtatactagtgttataactataçaattaagtaatatcaaggaaaa

taagtgtaatggaacagacgctaaggtaaaattgataaaacaagaattag

ataaatataaaagtgctgtaacagaattgcagttgctcatgcaaagcaca

ccggcaaccaacaatcgagccagaagagaactaccaaggtttatgaatta

tacactcaacaataccaaaaataccaatgtaacattaagcaagaaaagga

aaagaagatttcttggctttttgttaggtgttggatctgcaatcgccagt

ggcattgctgtatctaaggtcctgcacctagaaggggaagtgaacaaaat

caaaagtgctctactatccacaaacaaggctgtagtcagcttatcaaatg

gagttagtgtcttaaccagcaaagtgttagacctcaaaaactatatagat

aaacagttgttacctattgtgaacaagcaaagctgtagcatatcaaacat

tgaaactgtgatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagatta

ccagggaatttagtgttaatgcaggtgtaactacacctgtaagcacttat

atgttaacaaatagtgaattattatcattaatcaatgatatgcctataac

aaatgatcagaaaaagttaatgtccaacaatgttcaaatagttagacagc

aaagttactctatcatgtccataataaaggaggaagtcttagcatatgta

gtacaattaccactatatggtgtaatagatacaccttgttggaaactgca

cacatcccctctatgtacaaccaacacaaaggaagggtccaacatctgtt

taacaagaaccgacagaggatggtactgtgacaatgcaggatcagtatct

ttcttcccactagctgaaacatgtaaagttcaatcgaatcgagtattttg

tgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaagtaaatctctgcaaca

ttgacatattcaaccccaaatatgattgcaaaattatgacttcaaaaaca

gatgtaagcagctccgttatcacatctctaggagccattgtgtcatgcta

tggcaaaactaaatgtacagcatccaataaaaatcgtggaatcataaaga

cattttctaacgggtgtgattatgtatcaaataaggggtggacactgtg

tctgtaggtaatacattatattatgtaaataagcaagaaggcaaaagtct

ctatgtaaaaggtgaaccaataataaatttctatgacccattagtgttcc

cctctgatgaatttgatgcatcaatatctcaagtcaatgagaagattaac

cagagcctagcatttattcgtaaatccgatgaattattacataatgtaaa

tgctggtaaatccaccacaaatatcatgAACAATGAGTTTATGGAAGTTA

CAGAAAAGATCCAAATGGCATCGGATAATATTAATGATCTAATACAGTCA

GGAGTGAATACAAGGCTTCTTACAATTCAGAGTCATGTCCAGAATTATAT

ACCaATATCATTGACACAACAAATGTCGGATCTTAGGAAATTCATTAGTG

AAATTACAATTAGGAATGATAATCAAGAAGTGCCTCCACAAAGAATAACA

CATGATGTGGGCATAAAACCTTTAAATCCAGATGATTTTTGGAGATGCAC

GTCTGGTCTTCCATCTTTAATGAAAACTCCAAAAATAAGGTTAATGCCGG

GGCCGGGATTATTAGCTATGCCAACGACTGTTGATGGCTGTGTTAGAACT

CCGTCCTTAGTTATAAATGATCTGATTTATGCTTATACCTCaAATCTAAT

TACTCGAGGTTGCCAGGATATAGGAAAATCATATCAAGTATTACAGATAG

GGATAATAACTGTAAACTCAGACTTGGTACCTGACTTAAATCCTAGGATC

TCTCATACTTTCAACATAAATGACAATAGAAAGTCATGTTCTCTAGCACT

CCTAAAtACAGATGTATATCAACTGTGTTCGACTCCCAAAGTTGATGAAA

GATCAGATTATGCATCATCAGGCATAGAAGATATTGTACTTGATATtGTC

AATCATGATGGTTCAATCTCAACAACAAGATTTAAGAACAATAATATAAG

TTTTGATCAACCATATGCGGCATTATACCCATCTGTTGGACCAGGGATAT

ACTACAAAGGCAAAATAATATTTCTCGGGTATGGAGGTCTTGAACATCCA

ATAAATGAGAATGCAATCTGCAACACAACTGGGTGTCCCGGGAAAACGCA

GAGAGACTGCAATCAGGCATCTCATAGTCCcTGGTTTTCAGACAGAAGGA

TGGTCAACTCCATTATTGTTGTTGACAAGGGCTTAAACTCAATTCCAAAA

CTGAAGGTATGGACGATATCCATGAGACAAAATTACTGGGGGTCAGAAGG

AAGGCTACTTCTACTAGGTAACAAGATCTATATATATACAAGATCTACAA

GTTGGCATAGCAAGTTACAATTAGGAATAATTGATATTACTGATTACAGT

GATATAAGAATAAAATGGACATGGCATAATGTGtTATCAAGACCAGGAAA

CAATGAATGTCCATGGGGACATTCATGtCCAGATGGATGTATAACAGGAG

TATATACTGATGCATATCCgCTCAATCCCACAGGGAGCATTGTGTCATCT

GTCATATTAGACTCGCAAAAATCGAGAGTAAACCCAGTCATAACTTACTC

AACAtCAACTGAAAGGGTAAACGAGCTGGCCATCCGAAACAAAACACTCT

CAGCTGGATATACAACAACGAGCTGCATTACACACTATAACAAAGGATAT

TGTTTTCATATAGTAGAAATAAATCATAAAAGCTTAGACACATTCCAACC

TATGTTGTTCAAAACAGAGATTCCAAAAAGCTGCAGTTAA

[SEC ID NO: 55]

Figura 33C

MAPA (lineal) de: FrhumHNphum.sec comprobación: 9920 secuencia de ácidos nucleicos humanizada desde: 1 a:3090 de FRSVHNPiV3

GGGTGGTACACtAGtGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAGAA

CAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTGG

ACAAGTACAAGAGCGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACC

CCCGCCACCAACAACagaGCCAGGCGCGAGCTGCCCAGGTTCATGAACTA

CACCCTCAACAACACCAAGAACACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGcGcA

AGaggCGcTTCCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCTCCGCCATCGCCAGC

GGCATCGCGGTGTCCAAGGTCCTGCACCTGGAGGGGGAGGTGAACAAGAT

CAAGAGCGCCCTGCTCTCCACCAACAAGGCGGTGGTCAGCCTGTCCAACG

GCGTGAGCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGACCTCAAGAACTACATCGAC

AAGCAatTGCTCCCCATCGTGAACAAGCAGtcCTGCAGCATCTCTAACAT

TGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACAGGCTGCTGGAGATCA

CCAGGGAGTTCAGCGTGAACGCgGGcGTcACCACCCCGGTGAGCACCTAC

ATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGTCCCTGATCAACGACATGCCCATCAC

CAACGACCAGAAGAAGCTtATGTCCAACAACGTGCAGATCGTGCGCCAGC

AGAGCTACagCATCATGagCATCATCAAGGAGGAGGTGCTGGCCTACGTG

GTGCAGCTGCCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCCTGCTGGAAGCTGCA

CACCTCCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCTCCAACATCTGCC

TGACCCGCACCGACCGGGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCTCCGTGTCC

TTCTTCCCCCTGGCGGAGACCTGCAAGGTGCAGTCCAACCGCGTGTTCTG

CGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCAGCGAGGTGAACCTCTGCAACA

129
293
002/97

TCGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATtATGacctccaagacc

gacgtgagcagctccgtgatcacctccctgggcgccatcgtgtcctgcta

cggcaagaccaagtgtacagcctccaacaagaaccgcggcatcatcaaga

ccttctccaacggctgcgactacgtgtccaacaagggcgtggacaccgtg

tccgtgggcaacaccctgtactacgtgaacaagcaggagggcaagagcct

gtacgtgaagggcgagcccatcatcaacttctacgacccgctggtgttcc

cctccgacgagttcgacgcctccatctcccaggtgaacgagaagatcaac

cagagcctggccttcatccgcaagtccgacgagctgctgcacaacgtgaa

cgccggcaagtccaccaccaacatcatgaacaacgagttcatggaggtga

ccgagaagatccagatggcctccgacaacatcaacgacctgatccagtcc

ggcgtgaacacccggctgctgaccatccagagccacgtgcagaactacat

ccccatctccctgacccagcagatgtccgacctgcggaagttcatcagcg

agatcaccatccggaacgacaaccaggaggtgcccccccagaggatcacc

cacgacgtgggcataaagcccctgaaccccgacgacttctggcgctgcac

ctccggcctcccctccctgatgaagacccccaagataaggctgatgcccg

ggcccggcctgctggccatgcccaccaccgtggacggctgcgtgcgcacc

ccctccctggtgatcaacgacctgatctacgcctacacctccaacctgat

cacccgcggctgccaggacatcggcaagtcctaccaggtgctgcagatcg

gcatcatcaccgtgaactccgacctggtacccgacctgaaccccccggatc

tcccacaccttcaacatcaacgacaacaggaagtcctgctccctggccct

cctgaacaccgacgtgtaccagctgtgctccacgcccaaggtggacgagc

gctccgactacgccagctccggcatcgaggacatcgtgctggacatcgtc

aaccacgacggctccatctccaccacccgcttcaagaacaacaacatcag

cttcgaccagccctacgccgccctgtacccctccgtgggccccggcatct

294

actacaagggcaagatcatcttcctgggctacggcggcctggagcacccc

atcaacgagaacgccatctgcaacaccaccgggtgccccggcaagaccca

gcgggactgcaaccaggcctcccacagcccctggttctccgaccgccgca

tggtgaactccatcatcgtggtggacaagggcctgaactccatccccaag

ctgaaggtgtggaccatctccatgcggcagaactactggggctccgaggg

ccgcctgctgctgctgggcaacaagatctacatctacacccgctccacca

gctggcacagcaagctgcagctgggcatcatcgacatcaccgactacagc

gacatccgcatcaagtggacctggcacaacgtgctgagccggcccggcaa

caacgagtgcccctggggccactcctgccccgacggctgcatcaccggcg

tgtacaccgacgcctacccccctgaaccccaccggcagcatcgtgagctcc

gtgatcctggactcccagaagtcccgggtgaaccccgtgatcacctacag

cacctccaccgagcgcgtgaacgagctggccatccgcaacaagaccctga

gcgccggctacaccaccaccagctgcatcacccactacaacaagggctac

tgcttccacatcgtggagatcaaccacaagagcctggacaccttccagcc

catgctgttcaagaccgagatccccaagagctgcagctaa

[SEC ID NO : 56]

295
UU/99

Figura 34B: Impacto de humanización sobre el nivel de expresión de $F_{RSV}HN_{PIV3}$

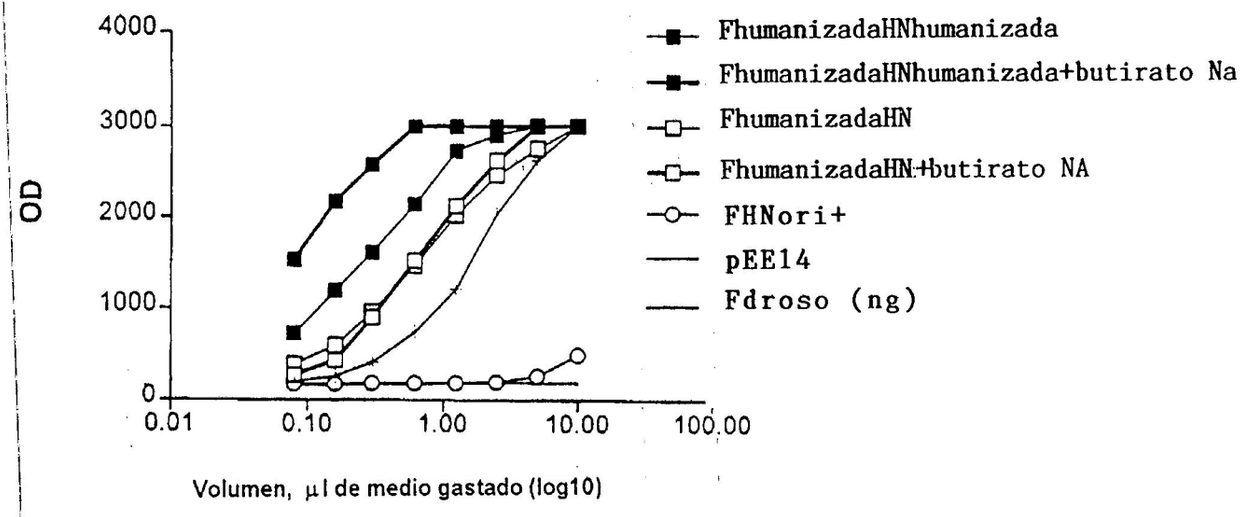


Figura 34A

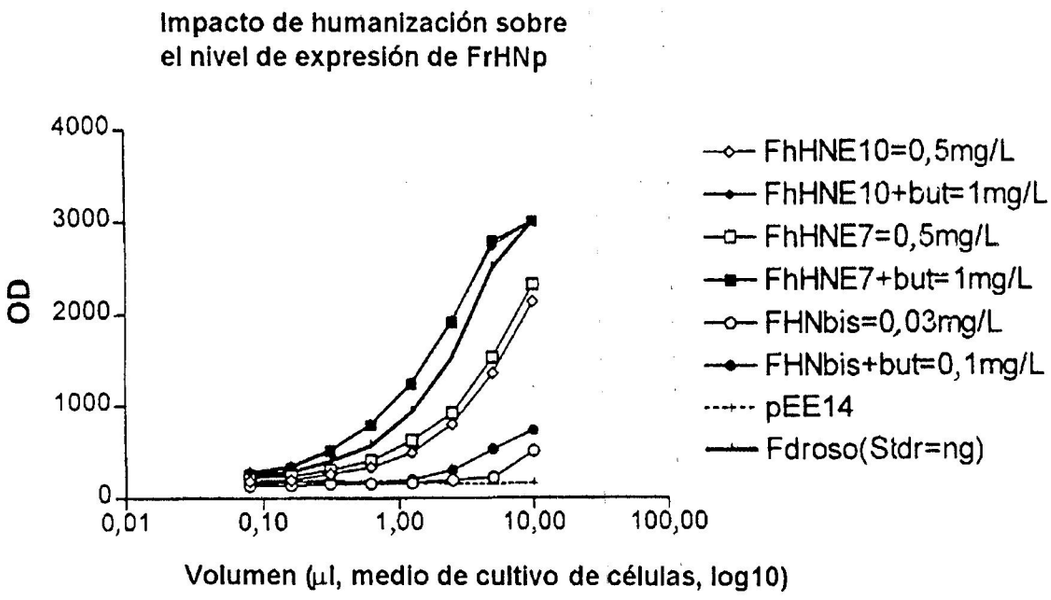

Impacto de humanización sobre
el nivel de expresión de FrHNp
4000
3000
2000
1000
0
OD
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
Volumen (µl, medio de cultivo de células, log10)
FhHNE10=0,5mg/L
FhHNE10+but=1mg/L
FhHNE7=0,5mg/L
FhHNE7+but=1mg/L
FHNbis=0,03mg/L
FHNbis+but=0,1mg/L
pEE14
Fdroso(Stdr=ng)

Fig 35: Uso de codones de $F_{MuV}H_{MV}$ y genes humanos de alta expresión (hum alta exp). Se muestran las frecuencias (x 100) de los codones individuales para cada uno de los aminoácidos codificados degeneradamente, y el codón más prevalente se muestra en negritas.

		hum alta exp	$F_{MuV}H_{MV}$
Ala	GCG	17	10
	A	13	**47**
	T	17	25
	C	**53**	18
Arg	AGG	18	**30**
	A	10	**30**
	CGG	21	10
	A	6	15
	T	7	8
	C	**37**	8
Asn	AAT	22	**60**
	C	**78**	40
Asp	GAT	25	**59**
	C	**75**	41
Cys	TGT	32	**56**
	C	**68**	44
Gln	CAG	**88**	32
	A	12	**68**
Glu	GAG	**75**	52
	A	25	**48**
Gly	GGG	24	24
	A	14	26
	T	12	**33**
	C	**50**	17
His	CAT	21	**60**
	C	**79**	40
Ile	ATA	5	25
	T	18	35
	C	**77**	**39**
Leu	TTG	6	**25**
	A	2	11
	CUG	**58**	15
	A	3	20
	T	5	14
	C	26	15
Lys	AAG	**82**	**51**
	A	18	49
Phe	TTT	20	39
	C	**80**	**61**
Pro	CCG	17	19
	A	16	**40**
	T	19	23
	C	**48**	19
Ser	AGT	10	19
	C	**34**	15
	TCG	9	5
	A	5	**30**
	T	13	17
	C	28	14
Thr	ACG	15	7
	A	14	**41**
	T	14	30
	C	**57**	21
Tyr	TAT	26	34
	C	**74**	**66**
Val	GTG	**64**	**34**
	A	5	10
	T	7	27
	C	25	29

Figura 36: Diagrama esquemático de la síntesis por PCR de cada fragmento en los que X e Y son sitios de restricción que permiten la recuperación del fragmento de tamaño entero a partir del vector de clonación.

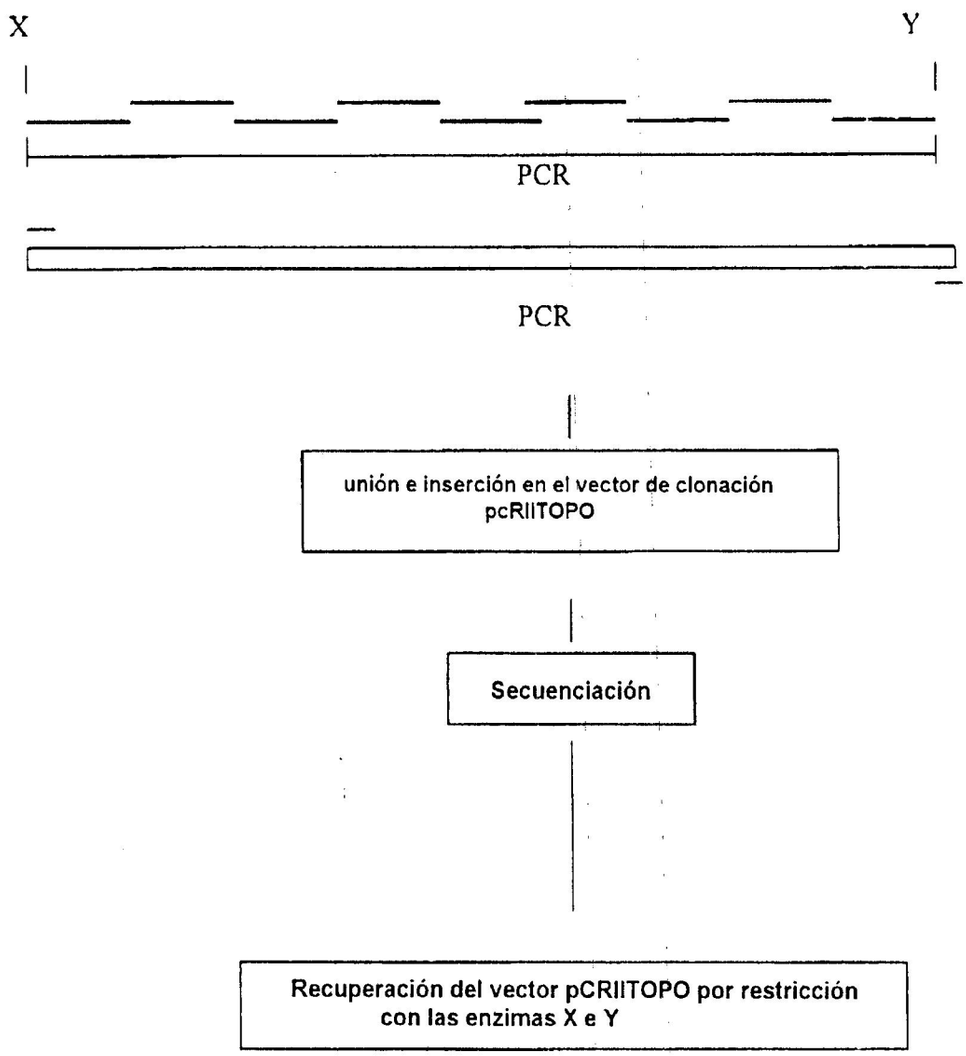


Figura 37: Secuencia de los doce oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento A de PCR.

1)oli 1 FmuvHmv 1-98,hom ARN
ggtctagaccaccATGAAGGCGTTCCCCGTGATCTGCCTGGGCTTCGCCATCTTCTCCAG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGCATCTGCGTGAACATCAACATCCTGCAGCAGATCG
---------+---------+---------+--------- 98

2) oli 2 FmuvHmv 82-181,inv comp ARN
GTTGGGCAGCAGCTTGACCACCACGTAGGAGCTGGAGCTCTGGGAGTAGTAGCTCAGCTG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CCTCACCTGCTGCTTGATGTATCCGATCTGCTGCAGGATG
---------+---------+---------+---------+ 100

3) oli 3 FmuvHmv, 166-264 hom ARN
CAAGCTGCTGCCCAACATCCAGCCCACCGACAACAGCTGCGAGTTCAAGAGCGTGACCCA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GTACAACAAGACCCTGAGCAACCTGCTGCTGCCCATCGC
---------+---------+---------+--------- 99

4) oli 4 FmuvHmv, 250-352, inv compARN
CAGGGCGGCGATGCCGATGGCGATGCCGGCGAACCGCTTGTGCCGCCGGGAGCCGGGGGA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGGGGAGGTGATGTTGTTGATGTTCTCGGCGATGGGCAGCAGC
---------+---------+---------+---------+--- 103

5) oli 5 FmuvHmv, 338-441, hom ARN
GGCATCGCCGCCCTGGGCGTGGCCACCGCCGCCCAGGTGACCGCCGCCGTGTCCCTGGTG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGGCCCAGACCAACGCCCGCGCCATCGCCGCCATGAAGAACTC
---------+---------+---------+---------+---- 104

6) oli 6 FMuvHmv, 427-523, inv comp ARN
GTCCTGGATGGCCTGCACGGCGATGGCCAGCTGCTGGGTGCCCTCCTTCACCTCGAACAC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGCGCGGTTGGTGGCCTGGATGGAGTTCTTCATGGCG
---------+---------+---------+------- 97

7) oli 7 FMUVHM 509-610, hom ARN
CAGGCCATCCAGGACCACATCAACACCATCATGAACACCCAGCTGAACAACATGTCCTGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGATCCTGGACAACCAGCTGGCCACCTCCCTGGGCCTGTAC
---------+---------+---------+---------+-- 102

8) oli 8 FMUHM, 595-691, inv comp ARN

```
GGACCGCAGGGCCTGGATACTGATGGGggaCAGGGCGGGGTTGATCAGCTGGGGCTGGAA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CACGGTGGTCAGCTCGGTCAGGTACAGGCCCAGGGAG
---------+---------+---------+------- 97
```

9) oli 9, 677-778, hom ARN

```
CAGGCCCTGCGGTCCCTGCTGGGCAGCATGACCCCCGCCGTGGTGCAGGCCACCCTGAGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
ACCTCCATCAGCGCCGCCGAGATCCTGAGCGCCGGCCTGATG
---------+---------+---------+---------+-- 102
```

10) oli 10, FmuvHmv, 763-862, inv comp ARN

```
GTTGGACTGGGTCACGATGGTGGGCACGTTGATCTTCACGATCATCTGCATCTCGTCCAG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGCACGGACACGATCTGGCCCTCCATCAGGCCGGCGCTC
---------+---------+---------+---------+ 100
```

11) oli 11, FmuvHmv, 848-949, homARN

```
GTGACCCAGTCCAACGCCCTGGTGATCGACTTCTACAGCATCAGCAGCTTCATCAACAAC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGGAGTCCATCATCCAGCTGCCCGACCGCATCCTGGAGATC
---------+---------+---------+---------+-- 102
```

12) oli 12 FMUHM, 935-1039, inv compARN

```
GCTCAGCCGCTCGGCCTCGTTGTACTGGCAGAAGATGTGGTGGCGGGTCAGCTTGCAGTT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CTTGGCGGGGTAGCGCCACTGCTCGTTGCCGATCTCCAGGATGCG
---------+---------+---------+---------+----- 105
```

[SEC ID NOS: 57-68 respectivamente]

Figura 38: Secuencia de los nueve oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento B de PCR.

12) oli 12 FMUHM, 935-1039, inv compARN

```
GCTCAGCCGCTCGGCCTCGTTGTACTGGCAGAAGATGTGGTGGCGGGTCAGCTTGCAGTT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CTTGGCGGGGTAGCGCCACTGCTCGTTGCCGATCTCCAGGATGCG
---------+---------+---------+---------+----- 105
```

13) oli 13, 1025-1129, hom ARN

```
GCCGAGCGGCTGAGCCTGGAGACCAAGCTGTGCCTGGCCGGCAACATCAGCGCCTGCGTG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
TTCTCCAGCATCGCCGGCAGCTACATGCGCCGCTTCGTGGCCCTG
---------+---------+---------+---------+----- 105
```

14) oli 14, 1115-1216, inv comp ARN

```
GGCGTGGTGGTCGGGCTGGTAGATGGGGTAGGAGGGGCTCTTGCACAGGCAGGTCAGGCT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GCGGCAGTTGGCCACGATGGTGCCGTCCAGGGCCACGAAGCG
---------+---------+---------+---------+-- 102
```

15) oli 15, 1202-1299, hom ARN

```
CCCGACCACCACGCCGTGACCACCATCGACCTGACCTCCTGCCAGACCCTGAGCCTGGAC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGCCTGGACTTCAGCATCGTGTCCCTGAGCAACATCAC
---------+---------+---------+-------- 98
```

16) oli 16 1285-1387, inv comp ARN

```
CTTGCTCAGCTCGGTGGAGATGTCGATGGGCTGGGTGTTGATGGTCTGGCTCAGGCTGAT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGTCAGGTTCTCGGCGTAGGTGATGTTGCTCAGG
---------+---------+---------+---- 94
```

17) oli 17, 1363-1462, hom ARN

```
CACCGAGCTGAGCAAGGTGAACGCCTCCCTGCAGAACGCCGTGAAGTACATCAAGGAGAG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAACCACCAGCTGCAGAGCGTGAGCGTGAGCAGCAAGCGC
---------+---------+---------+---------+ 100
```

18) oli 18, 1447-1550, inv comp ARN

```
TCACCTGGTGCTCGATGGAGTTGGTCACGTCCAGGTTGGTGCTCAGGCTCTTGTGGATCT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CGGCGGTGTAGATGGCGGCGCGGTGCAGGCGCTTGCTGCTCACG
---------+---------+---------+---------+---- 104
```

19) oli 19, 1534-1636, hom ARN

```
CATCGAGCACCAGGTGAAGGACGTGCTGACCCCCCTGTTCAAGATCATCGGCGACGAGGT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGGCCTGCGCACCCCCCAGCGCTTCACCGACCTGGTGAAGTTC
---------+---------+---------+---------+--- 103
```

20) oli 20 FmuvHmv, 1622-1718, inv comp ARN

```
GCTCGGGGGGGTTGATGCACCAGGTCAGGTCGCGGAAGTCGTACTCGCGGTCGGGGTTCA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGAACTTGATCTTGTCGGAGATGAACTTCACCAGGTC
---------+---------+---------+------- 97
```

[SEC ID NOS: 69-77 respectivamente]

Figura 39: Secuencia de los once oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento C de PCR.

20) oli 20 FmuvHmv, 1622-1718, inv comp ARN
GCTCGGGGGGGTTGATGCACCAGGTCAGGTCGCGGAAGTCGTACTCGCGGTCGGGGTTCA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGAACTTGATCTTGTCGGAGATGAACTTCACCAGGTC
---------+---------+---------+------- 97

21) oli 21, FmuvHmv, 1701-1799, hom ARN
GCATCAACCCCCCCGAGCGGATCAAGCTGGACTACGACCAGTACTGCGCCGACGTGGCCG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CCGAGGAGCTGATGAACGCCCTGGTGAACAGCACCCTGC
---------+---------+---------+--------- 99

22) oli 22,1784-1888, inv comp
CATGTTGCTGAACTGGCCCCGGATGGTGGTGGGGCCGCTGCAGTTGCCCTTGCTCACGGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGGAACTGGTTGGTGGTGCGGGTCTCCAGCAGGGTGCTGTTCAC
---------+---------+---------+---------+----- 105

23) oli 23, 1874-1971, hom ARN
CAGTTCAGCAACATGAGCCTGTCCCTGCTGGACCTGTACCTGGGCCGGGGCTACAACGTG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
AGCAGCATCGTGACCATGACCAGCCAGGGCATGTACGG
---------+---------+---------+-------- 98

24) oli 24, 1957-2057, inv.comp ARN
CCACCTCGAACACGCGGTACATGCTCAGCTGGCTCAGCTCGCTCCGCTTGCTGCTCAGGT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
TGGGCTTCTCCACCAGGTAGGTGCCGCCGTACATGCCCTGG
---------+---------+---------+---------+- 101

25) oli 25, FmuvHmv, 2043-2140, homARN
GCGTGTTCGAGGTGGGCGTGATCCGGAACCCCGGCCTGGGCGCCCCCGTGTTCCACATGA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CCAACTACCTGGAGCAGCCCGTGAGCAACGACCTGAGC
---------+---------+---------+-------- 98

26) oli26, FmuvHmv, 2125-2227, inv compARN
GCCGCTGCCCTGGTAGGGGATGGTGATGCTGTCCTCGCCGTGGCACAGGGCGGCCAGCTT
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGCTCGCCCAGGGCCACCATGCAGTTGCTCAGGTCGTTGCTC
---------+---------+---------+---------+--- 103

27) oli 27, 2212-2309, FmuvHm, hom ARN
CTACCAGGGCAGCGGCAAGGGCGTGAGCTTCCAGCTGGTGAAGCTGGGCGTGTGGAAGAG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CCCCACCGACATGCAGAGCTGGGTGCCCCTGAGCACCG
---------+---------+---------+-------- 98

28) oli 28,FmuvHmv, 2294-2392, inv comp ARN

```
GGTGGGCACGGCCCACTTGGCCTGGTTGTCGGCGATCACGCCGCGGTGGCTGCTCAGGTA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGGCGGTCGATCACGGGGTCGTCGGTGCTCAGGGGCAC
---------+---------+---------+---------+--------- 99
```

29) oli 29, Fmuv Hmv, 2377-2477, hom ARN

```
GTGGGCCGTGCCCACCACCCGCACCGACGACAAGCTGCGCATGGAGACCTGCTTCCAGCA
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGCCTGCAAGGGCAAGATCCAGGCCCTGTGCGAGAACCCCG
---------+---------+---------+---------+-- 101
```

30) oli 30, FmuvHmv 2462-2561, inv comp

```
TGATCTTCAGCTCCACGGTCAGGCTCAGGTCCACGCTCAGCACGCCGTAGCTGGGGATGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGTTGTCCTTCAGGGGGGCCCAtTCGGGGTTCTCGCACAG
---------+---------+---------+---------+ 100
```

[SEC ID NOS: 78-88 respectivamente]

Figura 40: Secuencia de los ocho oligonucleótidos a partir de los cuales se generó el fragmento D de PCR.

30) oli 30, FmuvHmv 2462-2561, inv comp
TGATCTTCAGCTCCACGGTCAGGCTCAGGTCCACGCTCAGCACGCCGTAGCTGGGGATGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
GGTTGTCCTTCAGGGGGGCCCAtTCGGGGTTCTCGCACAG
---------+---------+---------+---------+ 100

31) oli31, FmuvHmv, 2546-2649, hom ARN
GTGGAGCTGAAGATCAAGATCGCGAGCGGCTTCGGCCCCCTGATCACCCACGGCAGCGGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
ATGGACCTGTACAAGAGCAACCACAACAACGTGTACTGGCTGAC
---------+---------+---------+---------+---- 104

32) oli 32, FmuvHmv, 2635-2738, inv comp ARN
CGGTGAACAGGTAGGGGCTCACCTTGAAGCGGGGaATCCACTCCAGGGTGTTGATCACGC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CCAGGGCCAGGTTCTTCATGGGGGGGATGGTCAGCCAGTACACG
---------+---------+---------+---------+---- 104

33) oli 33, FmuvHmv, 2723-2827, hom ARN
CCCTACCTGTTCACCGTGCCCATCAAGGAGGCCGGCGAGGACTGCCACGCCCCGACCTAC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CTGCCCGCCGAGGTGGACGGCGACGTGAAGCTGAGCAGCAACCTG
---------+---------+---------+---------+----- 105

34) oli 34, FMUVHmv, 2813-2911, inv comp ARN
CACGTAGTACACCACGGCGTGCTCCACGCGGCTGGTGTCGTAGGTGGCCAGCACGTACTG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CAGGTCCTGGCCGGGCAGGATCACCAGGTTGCTGCTCAG
---------+---------+---------+--------- 99

35) oli 35 FMUHM, 2897-2995, homARN
GTGGTGTACTACGTGTACAGCCCCGGCCGCAGCTTCTTCTACTTCTACCCCTTCCGCCTG
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CCCATCAAGGGCGTGCCCATCGAGCTGCAGGTGGAGTGC
---------+---------+---------+--------- 99

36) oli 36, FmuvHmv, 2981-3078, inv comp ARN
CCGCTGTGGGTGATGTGGCCGCCGCTCTCGCTGTCGGCCAGCACGCAGAAGTGGCGGCAC
---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
CACAGCTTCTGGTCCCAGGTGAAGCACTCCACCTGCAG
---------+---------+---------+-------- 98

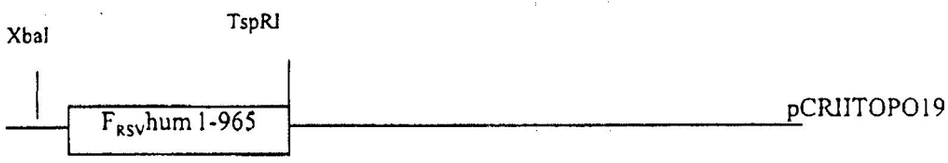
37) oli 37, 3064-3147, homARN

```
CATCACCCACAGCGGCATGGTGGGCATGGGCGTGAGCTGCACCGTGACCCGCGAGGACGG
---------+---------+---------+---------+---------+----------+ 60
CACCAACCGCCGCTAGcgaattcc
---------+---------+---- 84
```

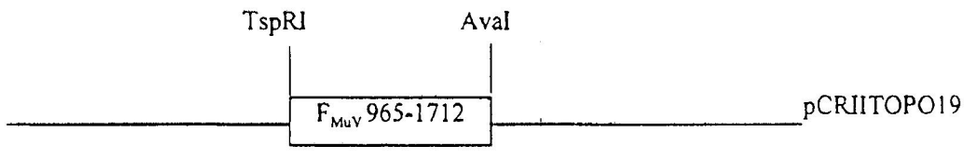
[SEC ID NOS: 89-96 respectivamente]

Figura 41: Construcción de pEE14F_{MuV}humHN$_{MV}$hum

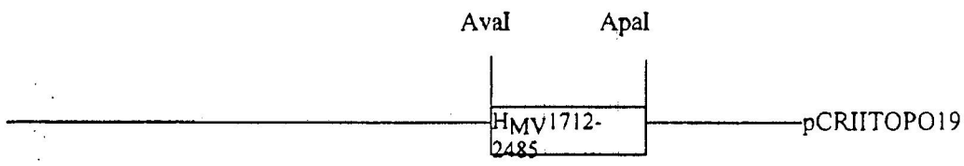
a) fragmento A de PCR



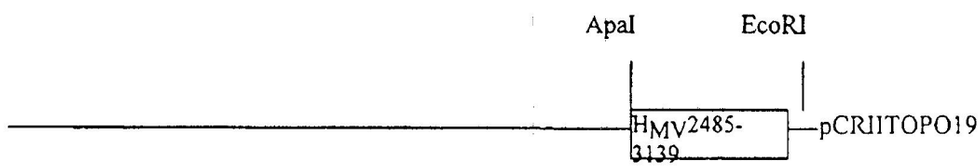
b) Fragmento B de PCR



c) Fragmento C de PCR



d) Fragmento D de PCR



d) pEE14 F_{MuV}hum H_{MV} hum

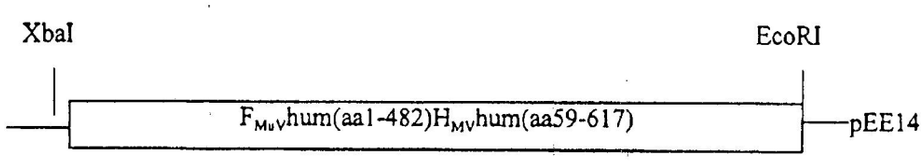


Figura 42A: Secuencia de ácido nucleico humanizada de $F_{MuV}H_{MV}$ (secuencia superior) en comparación con la secuencia original de $F_{MuV}H_{MV}$ (secuencia inferior) y la correspondiente secuencia de aminoácidos.

```
 14 ATGAAGGCGTTCCCCGTGATCTGCCTGGGCTTCGCCATCTTCTCCAGCAG 63
    ||||||||  ||  ||  ||  ||  |||  |||||||  ||  |||||  ||    |
  1 ATGAAGGCTTTTCCAGTTATTTGCTTGGGCTTTGCAATCTTTTCATCCTC 50

 64 CATCTGCGTGAACATCAACATCCTGCAGCAGATCGGATACATCAAGCAGC 113
     ||  ||  |||||  |||||  |||  |||||||  ||  |||||||||||||  |
 51 TATATGTGTGAATATCAATATCTTGCAGCAAATTGGATACATCAAGCAAC 100

114 AGGTGAGGCAGCTGAGCTACTACTCCCAGAGCTCCAGCTCCTACGTGGTG 163
    ||||  |||||  ||  |||||  |||||  ||  ||  ||  ||||||||||  |||
101 AGGTCAGGCAACTAAGCTATTACTCACAAAGTTCAAGCTCCTACGTAGTG 150

164 GTCAAGCTGCTGCCCAACATCCAGCCCACCGACAACAGCTGCGAGTTCAA 213
    ||||||||   |  ||  ||  |||||  |||||  ||  ||||||||  ||  ||  ||
151 GTCAAGCTTTTACCGAATATCCAACCCACTGATAACAGCTGTGAATTTAA 200

214 GAGCGTGACCCAGTACAACAAGACCCTGAGCAACCTGCTGCTGCCCATCG 263
    |||  ||  ||  ||  |||||  ||||||  ||||  ||   ||||  ||  ||  ||  |
201 GAGTGTAACTCAATACAATAAGACCTTGAGTAATTTGCTTCTTCCAATTG 250

264 CCGAGAACATCAACAACATCACCTCCCCCTCCCCCGGCTCCCGGCGGCAC 313
    |  ||  |||||  |||||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||  ||   |  ||  ||
251 CAGAAAACATAAACAATATTACGTCGCCCTCACCTGGGTCAAGACGTCAT 300

314 AAGCGGTTCGCCGGCATCGCCATCGGCATCGCCGCCCTGGGCGTGGCCAC 363
    ||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  ||  |||||  ||  ||  ||  ||
301 AAACGGTTTGCTGGCATTGCCATTGGCATTGCgGCcCTCGGTGTTGCGAC 350

364 CGCCGCCCAGGTGACCGCCGCCGTGTCCCTGGTGCAGGCCCAGACCAACG 413
    |||  ||  ||  |||||  |||||  ||  ||   |  ||  ||  ||  |||||  ||  |
351 CGCAGCACAAGTGACTGCCGCTGTCTCATTAGTTCAAGCACAGACAAATG 400

414 CCCGCGCCATCGCCGCCATGAAGAACTCCATCCAGGCCACCAACCGCGCC 463
    |  ||  ||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||  ||  ||
401 CACGTGCAATAGCAGCGATGAAAAATTCAATACAGGCAACTAATCGGGCA 450

464 GTGTTCGAGGTGAAGGAGGGCACCCAGCAGCTGGCCATCGCCGTGCAGGC 513
    ||  |||||  ||||||||  ||||||||  |||  |  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
451 GTCTTCGAAGTGAAGGAAGGCACCCAACAGTTAGCTATAGCGGTACAAGC 500

514 CATCCAGGACCACATCAACACCATCATGAACACCCAGCTGAACAACATGT 563
    ||||||  |||||  |||||  ||  ||  ||||||||||  |||||||  ||||
501 cATcCAAGACCATATCAATACTATTATGAACACCCAATTGAACAATATGT 550
```

```
564 CCTGCCAGATCCTGGACAACCAGCTGGCCACCTCCCTGGGCCTGTACCTG 613
    | || |||||||| || |||||||| || |||||||| ||  | |||||
551 CTTGTCAGATCCTTGATAACCAGCTTGCAACCTCCCTAGGATTATACCTA 600

614 ACCGAGCTGACCACCGTGTTCCAGCCCCAGCTGATCAACCCCGCCCTGtc 663
    || ||  | || || ||||| ||||| ||  | || || || ||  ||||
601 ACAGAATTAACAACAGTGTTTCAGCCACAATTAATTAATCCAGCATTGTC 650

664 cCCCATCAGTATCCAGGCCCTGCGGTCCCTGCTGGGCAGCATGACCCCCG 713
     || || ||||| || ||| || ||||  |||| || || ||||| || |
651 ACCGATTAGTATACAAGCCTTGAGGTCTTTGCTTGGAAGTATGACACCTG 700

714 CCGTGGTGCAGGCCACCCTGAGCACCTCCATCAGCGCCGCCGAGATCCTG 763
    | ||||| || || ||  |    || || ||    || || || || ||
701 CAGTGGTTCAAGCAACATTATCTACTTCAATTTCTGCTGCTGAAATACTA 750

764 AGCGCCGGCCTGATGGAGGGCCAGATCGTGTCCGTGCTGCTGGACGAGAT 813
    || ||||| || |||||||| ||||| || || || ||||| || |||||
751 AGTGCCGGTCTAATGGAGGGTCAGATAGTTTCTGTTCTGCTAGATGAGAT 800

814 GCAGATGATCGTGAAGATCAACGTGCCCACCATCGTGACCCAGTCCAACG 863
    ||||||||| || ||||| ||||| || ||||| || || || || || |
801 GCAGATGATAGTTAAGATAAACGTTCCAACCATTGTCACACAATCAAATG 850

864 CCCTGGTGATCGACTTCTACAGCATCAGCAGCTTCATCAACAACCAGGAG 913
    |  ||||||| |||||||||   ||    || || || || || || ||
851 CATTGGTGATTGACTTCTACTCAATTTCGAGTTTTATTAATAATCAAGAA 900

914 TCCATCATCCAGCTGCCCGACCGCATCCTGGAGATCGGCAACGAGCAGTG 963
    ||||| || ||  |||| ||| | ||| |||||||||| || || || ||
901 TCCATAATTCAATTGCCAGACAGGATCTTGGAGATCGGAAATGAACAATG 950

964 GCGCTACCCCGCCAAGAACTGCAAGCTGACCCGCCACCACATCTTCTGCC 1013
    |||||| || || ||||| || ||| ||||  | |||||||| |||||||
951 GCGCTATCCAGCTAAGAATTGTAAGTTGACAAGACACCACATATTCTGCC 1000

1014 AGTACAACGAGGCCGAGCGGCTGAGCCTGGAGACCAAGCTGTGCCTGGCC 1063
     | ||||| ||||| ||| |||||||||| || || || || ||||| ||
1001 AATACAATGAGGCAGAGAGGCTGAGCCTAGAAACAAAACTATGCCTTGCA 1050

1064 GGCAACATCAGCGCCTGCGTGTTCTCCAGCATCGCCGGCAGCTACATGCG 1113
     ||||| || || ||||| ||||||||    || || || || || ||| |
1051 GGCAATATTAGTGCCTGTGTGTTCTCATCTATAGCAGGGAGTTATATGAG 1100

1114 CCGCTTCGTGGCCCTGGACGGCACCATCGTGGCCAACTGCCGCAGCCTGA 1163
      || || || || ||||| || || || || || ||||| || || || |
1101 GCGATTTGTAGCACTGGATGGAACAATTGTTGCAAACTGTCGAAGTCTAA 1150

1164 CCTGCCTGTGCAAGAGCCCCTCCTACCCCATCTACCAGCCCGACCACCAC 1213
     | || || |||||||| || || || || || ||||| || ||||| ||
1151 CGTGTCTATGCAAGAGTCCATCTTATCCTATATACCAACCTGACCATCAT 1200
```

```
1214 GCCGTGACCACCATCGACCTGACCTCCTGCCAGACCCTGAGCCTGGACGG 1263
1201 GCAGTCACGACCATTGATCTAACGTCATGTCAAACATTGTCCCTGGACGG 1250

1264 CCTGGACTTCAGCATCGTGTCCCTGAGCAACATCACCTACGCCGAGAACC 1313
1251 ACTGGATTTCAGCATTGTCTCGCTAAGCAACATCACTTACGCTGAGAATC 1300

1314 TGACCATCAGCCTGAGCCAGACCATCAACACCCAGCCCATCGACATCTCC 1363
1301 TTACTATTTCATTGTCTCAGACAATCAATACTCAACCCATTGATATATCA 1350

1364 ACCGAGCTGAGCAAGGTGAACGCCTCCCTGCAGAACGCCGTGAAGTACAT 1413
1351 ACTGAGCTGAGTAAGGTTAATGCATCCCTCCAAAATGCCGTTAAATACAT 1400

1414 CAAGGAGAGCAACCACCAGCTGCAGAGCGTGAGCGTGAGCAGCAAGCGCC 1463
1401 AAAAGAGAGTAACCATCAACTCCAATCCGTTAGTGTAAGTTCTAAAAGAC 1450

1464 TGCACCGCGCCGCCATCTACACCGCCGAGATCCACAAGAGCCTGAGCACC 1513
1451 TTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATAAAAGCCTCAGCACC 1500

1514 AACCTGGACGTGACCAACTCCATCGAGCACCAGGTGAAGGACGTGCTGAC 1563
1501 AATCTAGATGTAACTAACTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGAC 1550

1564 CCCCCTGTTCAAGATCATCGGCGACGAGGTGGGCCTGCGCACCCCCCAGC 1613
1551 ACCACTCTTCAAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCCTGAGGACACCTCAGA 1600

1614 GCTTCACCGACCTGGTGAAGTTCATCTCCGACAAGATCAAGTTCCTGAAC 1663
1601 GATTCACTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTAAATTCCTTAAT 1650

1664 CCCGACCGCGAGTACGACTTCCGCGACCTGACCTGGTGCATCAACCCCCC 1713
1651 CCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCC 1700

1714 CGAGCGGATCAAGCTGGACTACGACCAGTACTGCGCCGACGTGGCCGCCG 1763
1701 AGAGAGAATCAAATTGGATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTG 1750

1764 AGGAGCTGATGAACGCCCTGGTGAACAGCACCCTGCTGGAGACCCGCACC 1813
1751 AAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACTCAACTCTACTGGAGACCAGAACA 1800

1814 ACCAACCAGTTCCTGGCCGTGAGCAAGGGCAACTGCAGCGGCCCCACCAC 1863
1801 ACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCCACTAC 1850
```

311

```
1864 CATCCGGGGCCAGTTCAGCAACATGAGCCTGTCCCTGCTGGACCTGTACC 1913
     ||| | || || |||   ||||||   |||||||||| | ||| ||||
1851 AATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATT 1900

1914 TGGGCCGGGGCTACAACGTGAGCAGCATCGTGACCATGACCAGCCAGGGC 1963
     | || || || ||||| |||      || || || |||||   ||||||
1901 TAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCCAGGGA 1950

1964 ATGTACGGCGGCACCTACCTGGTGGAGAAGCCCAACCTGAGCAGCAAGCG 2013
     ||||| || || || ||||| ||||| ||||| || |||||||||||  |
1951 ATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAG 2000

2014 GAGCGAGCTGAGCCAGCTGAGCATGTACCGCGTGTTCGAGGTGGGCGTGA 2063
     |   ||| ||   || ||||||||||||||| ||||| || || || || |
2001 GTCAGAGTTGTCACAACTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTA 2050

2064 TCCGGAACCCCGGCCTGGGCGCCCCCGTGTTCCACATGACCAACTACCTG 2113
     || | || || ||  |||| || || |||||||| ||||| ||||| ||
2051 TCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCCATATGACAAACTATCTT 2100

2114 GAGCAGCCCGTGAGCAACGACCTGAGCAACTGCATGGTGGCCCTGGGCGA 2163
     ||||| || || || || || || |||||||| |||||||  |||| ||
2101 GAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGA 2150

2164 GCTGAAGCTGGCCGCCCTGTGCCACGGCGAGGACAGCATCACCATCCCCT 2213
     ||| || || || ||||| || ||||| || ||   ||||| || ||||
2151 GCTCAAACTCGCAGCCCTTTGTCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCCT 2200

2214 ACCAGGGCAGCGGCAAGGGCGTGAGCTTCCAGCTGGTGAAGCTGGGCGTG 2263
     | |||||    || || || || ||||||||||| || ||||| || ||
2201 ATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTC 2250

2264 TGGAAGAGCCCCACCGACATGCAGAGCTGGGTGCCCCTGAGCACCGACGA 2313
     |||||   ||| |||||||||||   |||||| ||| |    || || ||
2251 TGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCCTTATCAACGGATGA 2300

2314 CCCCGTGATCGACCGCCTGTACCTGAGCAGCCACCGCGGCGTGATCGCCG 2363
      || ||||| ||| | || |||||       ||| | || || ||||| |
2301 TCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGTGTTATCGCTG 2350

2364 ACAACCAGGCCAAGTGGGCCGTGCCCACCACCCGCACCGACGACAAGCTG 2413
     ||||||| || || ||||| || || || || || || || |||||| ||
2351 ACAAcCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTG 2400

2414 CGCATGGAGACCTGCTTCCAGCAGGCCTGCAAGGGCAAGATCCAGGCCCT 2463
     || |||||||| |||||||| ||||| || ||||| || ||||| || ||
2401 CGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAGGGTAAAATCCAAGCACT 2450

2464 GTGCGAGAACCCCGAaTGGGCCCCCCTGAAGGACAACCGCATCCCCAGCT 2513
      |||||||| ||||| ||||| ||  ||||||| |+| | || ||    |
2451 CTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTCCTTCAT 2500
```

```
2514 ACGGCGTGCTGAGCGTGGACCTGAGCCTGACCGTGGAGCTGAAGATCAAG 2563
     |||| ||  ||   || || ||||| ||||| || ||||| || |||||
2501 ACGGGGTCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAA 2550

2564 ATCGCGAGCGGCTTCGGCCCCCTGATCACCCACGGCAGCGGCATGGACCT 2613
     || ||    || ||||| ||  ||||||| |||||    || ||||||||
2551 ATTGCTTCGGGATTCGGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCT 2600

2614 GTACAAGAGCAACCACAACAACGTGTACTGGCTGACCATCCCCCCCATGA 2663
      |||||   |||||||||||| ||||| |||||||| ||||| || ||||
2601 ATACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAATGA 2650

2664 AGAACCTGGCCCTGGGCGTGATCAACACCCTGGAGTGGATtCCCCGCTTC 2713
     ||||||| ||| | || || |||||||| |||||||||| ||  | |||
2651 AGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTGGAGTGGATACCGAGATTC 2700

2714 AAGGTGAGCCCCTACCTGTTCACCGTGCCCATCAAGGAGGCCGGCGAGGA 2763
     ||||| || |||||||| ||||| || || || ||||| || ||||| ||
2701 AAGGTTAGTCCCTACCTCTTCAcTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGAAGA 2750

2764 CTGCCACGCCCCGACCTACCTGCCCGCCGAGGTGGACGGCGACGTGAAGC 2813
     |||||| ||||| || ||||| || || |||||||| || || || || |
2751 CTGCCATGCCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGATGTCAAAC 2800

2814 TGAGCAGCAACCTGGTGATCCTGCCCGGCCAGGACCTGCAGTACGTGCTG 2863
     | ||   ||| |||||||| || || || || || || || || || ||  ||
2801 TCAGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTG 2850

2864 GCCACCTACGACACCAGCCGCGTGGAGCACGCCGTGGTGTACTACGTGTA 2913
     || |||||||| ||    | | || || || || ||||| || ||||| ||
2851 GCAACCTACGATACTTCCAGGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTA 2900

2914 CAGCCCCGGCCGCAGCTTCTTCTACTTCTACCCCTTCCGCCTGCCCATCA 2963
     |||||| ||||||   || || ||||| || || ||  |  |||| || |
2901 CAGCCCAgGCCGCTCATTTTtTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAA 2950

2964 AGGGCGTGCCCATCGAGCTGCAGGTGGAGTGCTTCACCTGGGACCAGAAG 3013
     |||| || ||||||||  | || ||||| |||||||| |||||||| ||
2951 AGGGGGTCCCCATCGAATTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAA 3000

3014 CTGTGGTGCCGCCACTTCTGCGTGCTGGCCGACAGCGAGAGCGGCGGCCA 3063
     || |||||||| |||||||| ||||| || ||| ||    || || || ||
3001 CTCTGGTGCCGTCACTTCTGTGTGCTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACA 3050

3064 CATCACCCACAGCGGCATGGTGGGCATGGGCGTGAGCTGCACCGTGACCC 3113
      ||||| |||   || |||||||||||||| || |||||||| || ||||
3051 TATCACTCACTCTGGGATGGtGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCACCC 3100

3114 GCGAGGACGGCACCAACCGCCGCTAG 3139
     | || || || ||||| ||| | |||
3101 GGGAAGATGGAACCAATCGCAGATAG 3126
```

Figura 42 B: $F_{MU}H_{MV}$.seq comprobación: 4381 secuencia de ácido nucleico desde: 1 a: 3126 de $F_{MU}H_{MV}$ (no humanizada)

ATGAAGGCTTTTCCAGTTATTTGCTTGGGCTTTGCAATCTTTTCATCCTC

TATATGTGTGAATATCAATATCTTGCAGCAAATTGGATACATCAAGCAAC

AGGTCAGGCAACTAAGCTATTACTCACAAAGTTCAAGCTCCTACGTAGTG

GTCAAGCTTTTACCGAATATCCAACCCACTGATAACAGCTGTGAATTTAA

GAGTGTAACTCAATACAATAAGACCTTGAGTAATTTGCTTCTTCCAATTG

CAGAAAACATAAACAATATTACGTCGCCCTCACCTGGGTCAAGACGTCAT

AAACGGTTTGCTGGCATTGCCATTGGCATTGCgGCcCTCGGTGTTGCGAC

CGCAGCACAAGTGACTGCCGCTGTCTCATTAGTTCAAGCACAGACAAATG

CACGTGCAATAGCAGCGATGAAAAATTCAATACAGGCAACTAATCGGGCA

GTCTTCGAAGTGAAGGAAGGCACCCAACAGTTAGCTATAGCGGTACAAGC

cATcCAAGACCATATCAATACTATTATGAACACCCAATTGAACAATATGT

CTTGTCAGATCCTTGATAACCAGCTTGCAACCTCCCTAGGATTATACCTA

ACAGAATTAACAACAGTGTTTCAGCCACAATTAATTAATCCAGCATTGTC

ACCGATTAGTATACAAGCCTTGAGGTCTTTGCTTGGAAGTATGACACCTG

CAGTGGTTCAAGCAACATTATCTACTTCAATTTCTGCTGCTGAAATACTA

AGTGCCGGTCTAATGGAGGGTCAGATAGTTTCTGTTCTGCTAGATGAGAT

GCAGATGATAGTTAAGATAAACGTTCCAACCATTGTCACACAATCAAATG

CATTGGTGATTGACTTCTACTCAATTTCGAGTTTTATTAATAATCAAGAA

TCCATAATTCAATTGCCAGACAGGATCTTGGAGATCGGAAATGAACAATG

GCGCTATCCAGCTAAGAATTGTAAGTTGACAAGACACCACATATTCTGCC

AATACAATGAGGCAGAGAGGCTGAGCCTAGAAACAAAACTATGCCTTGCA

GGCAATATTAGTGCCTGTGTGTTCTCATCTATAGCAGGGAGTTATATGAG

GCGATTTGTAGCACTGGATGGAACAATTGTTGCAAACTGTCGAAGTCTAA

CGTGTCTATGCAAGAGTCCATCTTATCCTATATACCAACCTGACCATCAT

GCAGTCACGACCATTGATCTAACGTCATGTCAAACATTGTCCCTGGACGG

ACTGGATTTCAGCATTGTCTCGCTAAGCAACATCACTTACGCTGAGAATC

TTACTATTTCATTGTCTCAGACAATCAATACTCAACCCATTGATATATCA

ACTGAGCTGAGTAAGGTTAATGCATCCCTCCAAAATGCCGTTAAATACAT

AAAAGAGAGTAACCATCAACTCCAATCCGTTAGTGTAAGTTCTAAAAGAC

TTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATAAAAGCCTCAGCACC

AATCTAGATGTAACTAACTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGAC

ACCACTCTTCAAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCCTGAGGACACCTCAGA

GATTCACTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTAAATTCCTTAAT

CCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCC

AGAGAGAATCAAATTGGATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTG

AAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACTCAACTCTACTGGAGACCAGAACA

ACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCCACTAC

AATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATT

TAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCCAGGGA

ATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAG

GTCAGAGTTGTCACAACTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTA

TCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCCATATGACAAACTATCTT

GAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGA

GCTCAAACTCGCAGCCCTTTGTCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCCT

ATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTC

TGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCCTTATCAACGGATGA

TCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGTGTTATCGCTG

ACAAcCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTG

CGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAGGGTAAAATCCAAGCACT

CTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTCCTTCAT

ACGGGGTCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAA

ATTGCTTCGGGATTCGGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCT

ATACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAATGA

AGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTGGAGTGGATACCGAGATTC

AAGGTTAGTCCCTACCTCTTCAcTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGAAGA

CTGCCATGCCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGATGTCAAAC

TCAGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTG

GCAACCTACGATACTTCCAGGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTA

CAGCCCAgGCCGCTCATTTTtTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAA

AGGGGGTCCCCATCGAATTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAA

CTCTGGTGCCGTCACTTCTGTGTGCTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACA

TATCACTCACTCTGGGATGGtGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCACCC

GGGAAGATGGAACCAATCGCAGATAG

[SEC ID NO: 97]

Fig 42 C: $F_{MUV}humH_{M}hum.seq$ comprobación: 5778 secuencia de ácido nucleico humanizada desde: 14 a: 3139 de $F_{MuV}H_{Mv}$

ATGAAGGCGTTCCCCGTGATCTGCCTGGGCTTCGCCATCTTCTCCAGCAG

CATCTGCGTGAACATCAACATCCTGCAGCAGATCGGATACATCAAGCAGC

AGGTGAGGCAGCTGAGCTACTACTCCCAGAGCTCCAGCTCCTACGTGGTG

GTCAAGCTGCTGCCCAACATCCAGCCCACCGACAACAGCTGCGAGTTCAA

GAGCGTGACCCAGTACAACAAGACCCTGAGCAACCTGCTGCTGCCCATCG

CCGAGAACATCAACAACATCACCTCCCCCTCCCCCGGCTCCCGGCGGCAC

AAGCGGTTCGCCGGCATCGCCATCGGCATCGCCGCCCTGGGCGTGGCCAC

CGCCGCCCAGGTGACCGCCGCCGTGTCCCTGGTGCAGGCCCAGACCAACG

CCCGCGCCATCGCCGCCATGAAGAACTCCATCCAGGCCACCAACCGCGCC

GTGTTCGAGGTGAAGGAGGGCACCCAGCAGCTGGCCATCGCCGTGCAGGC

CATCCAGGACCACATCAACACCATCATGAACACCCAGCTGAACAACATGT

CCTGCCAGATCCTGGACAACCAGCTGGCCACCTCCCTGGGCCTGTACCTG

ACCGAGCTGACCACCGTGTTCCAGCCCCAGCTGATCAACCCCGCCCTGtc

cCCCATCAGTATCCAGGCCCTGCGGTCCCTGCTGGGCAGCATGACCCCCG

CCGTGGTGCAGGCCACCCTGAGCACCTCCATCAGCGCCGCCGAGATCCTG

AGCGCCGGCCTGATGGAGGGCCAGATCGTGTCCGTGCTGCTGGACGAGAT

GCAGATGATCGTGAAGATCAACGTGCCCACCATCGTGACCCAGTCCAACG

CCCTGGTGATCGACTTCTACAGCATCAGCAGCTTCATCAACAACCAGGAG

TCCATCATCCAGCTGCCCGACCGCATCCTGGAGATCGGCAACGAGCAGTG

GCGCTACCCCGCCAAGAACTGCAAGCTGACCCGCCACCACATCTTCTGCC

AGTACAACGAGGCCGAGCGGCTGAGCCTGGAGACCAAGCTGTGCCTGGCC

GGCAACATCAGCGCCTGCGTGTTCTCCAGCATCGCCGGCAGCTACATGCG

CCGCTTCGTGGCCCTGGACGGCACCATCGTGGCCAACTGCCGCAGCCTGA

CCTGCCTGTGCAAGAGCCCCTCCTACCCCATCTACCAGCCCGACCACCAC

GCCGTGACCACCATCGACCTGACCTCCTGCCAGACCCTGAGCCTGGACGG

CCTGGACTTCAGCATCGTGTCCCTGAGCAACATCACCTACGCCGAGAACC

TGACCATCAGCCTGAGCCAGACCATCAACACCCAGCCCATCGACATCTCC

ACCGAGCTGAGCAAGGTGAACGCCTCCCTGCAGAACGCCGTGAAGTACAT

CAAGGAGAGCAACCACCAGCTGCAGAGCGTGAGCGTGAGCAGCAAGCGCC

TGCACCGCGCCGCCATCTACACCGCCGAGATCCACAAGAGCCTGAGCACC

AACCTGGACGTGACCAACTCCATCGAGCACCAGGTGAAGGACGTGCTGAC

CCCCCTGTTCAAGATCATCGGCGACGAGGTGGGCCTGCGCACCCCCCAGC

GCTTCACCGACCTGGTGAAGTTCATCTCCGACAAGATCAAGTTCCTGAAC

CCCGACCGCGAGTACGACTTCCGCGACCTGACCTGGTGCATCAACCCCCC

CGAGCGGATCAAGCTGGACTACGACCAGTACTGCGCCGACGTGGCCGCCG

AGGAGCTGATGAACGCCCTGGTGAACAGCACCCTGCTGGAGACCCGCACC

ACCAACCAGTTCCTGGCCGTGAGCAAGGGCAACTGCAGCGGCCCCACCAC

CATCCGGGGCCAGTTCAGCAACATGAGCCTGTCCCTGCTGGACCTGTACC

TGGGCCGGGGCTACAACGTGAGCAGCATCGTGACCATGACCAGCCAGGGC

ATGTACGGCGGCACCTACCTGGTGGAGAAGCCCAACCTGAGCAGCAAGCG

GAGCGAGCTGAGCCAGCTGAGCATGTACCGCGTGTTCGAGGTGGGCGTGA

TCCGGAACCCCGGCCTGGGCGCCCCCGTGTTCCACATGACCAACTACCTG

GAGCAGCCCGTGAGCAACGACCTGAGCAACTGCATGGTGGCCCTGGGCGA

GCTGAAGCTGGCCGCCCTGTGCCACGGCGAGGACAGCATCACCATCCCCT

ACCAGGGCAGCGGCAAGGGCGTGAGCTTCCAGCTGGTGAAGCTGGGCGTG

TGGAAGAGCCCCACCGACATGCAGAGCTGGGTGCCCCTGAGCACCGACGA

CCCCGTGATCGACCGCCTGTACCTGAGCAGCCACCGCGGCGTGATCGCCG

ACAACCAGGCCAAGTGGGCCGTGCCCACCACCCGCACCGACGACAAGCTG

CGCATGGAGACCTGCTTCCAGCAGGCCTGCAAGGGCAAGATCCAGGCCCT

GTGCGAGAACCCCGAaTGGGCCCCCCTGAAGGACAACCGCATCCCCAGCT

ACGGCGTGCTGAGCGTGGACCTGAGCCTGACCGTGGAGCTGAAGATCAAG

ATCGCGAGCGGCTTCGGCCCCCTGATCACCCACGGCAGCGGCATGGACCT

GTACAAGAGCAACCACAACAACGTGTACTGGCTGACCATCCCCCCCATGA

AGAACCTGGCCCTGGGCGTGATCAACACCCTGGAGTGGATtCCCCGCTTC

AAGGTGAGCCCCTACCTGTTCACCGTGCCCATCAAGGAGGCCGGCGAGGA

CTGCCACGCCCCGACCTACCTGCCCGCCGAGGTGGACGGCGACGTGAAGC

TGAGCAGCAACCTGGTGATCCTGCCCGGCCAGGACCTGCAGTACGTGCTG

GCCACCTACGACACCAGCCGCGTGGAGCACGCCGTGGTGTACTACGTGTA

CAGCCCCGGCCGCAGCTTCTTCTACTTCTACCCCTTCCGCCTGCCCATCA

AGGGCGTGCCCATCGAGCTGCAGGTGGAGTGCTTCACCTGGGACCAGAAG

CTGTGGTGCCGCCACTTCTGCGTGCTGGCCGACAGCGAGAGCGGCGGCCA

CATCACCCACAGCGGCATGGTGGGCATGGGCGTGAGCTGCACCGTGACCC

GCGAGGACGGCACCAACCGCCGCTAG

[SEC ID NO: 98]

319

Figura 43: IgG total dirigida contra la proteína FHN

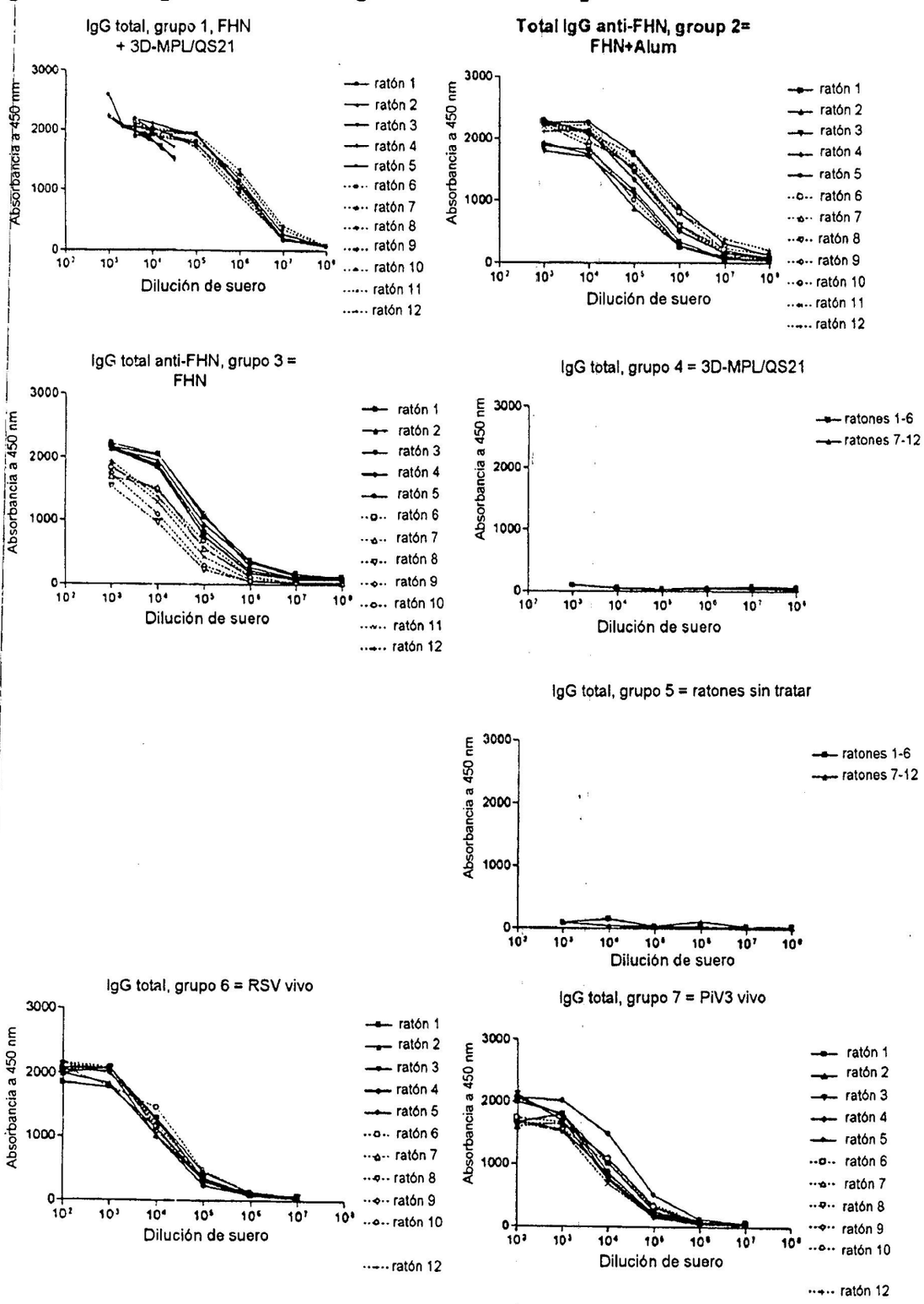


Figura 44: IgG1 dirigida contra la proteína FHN

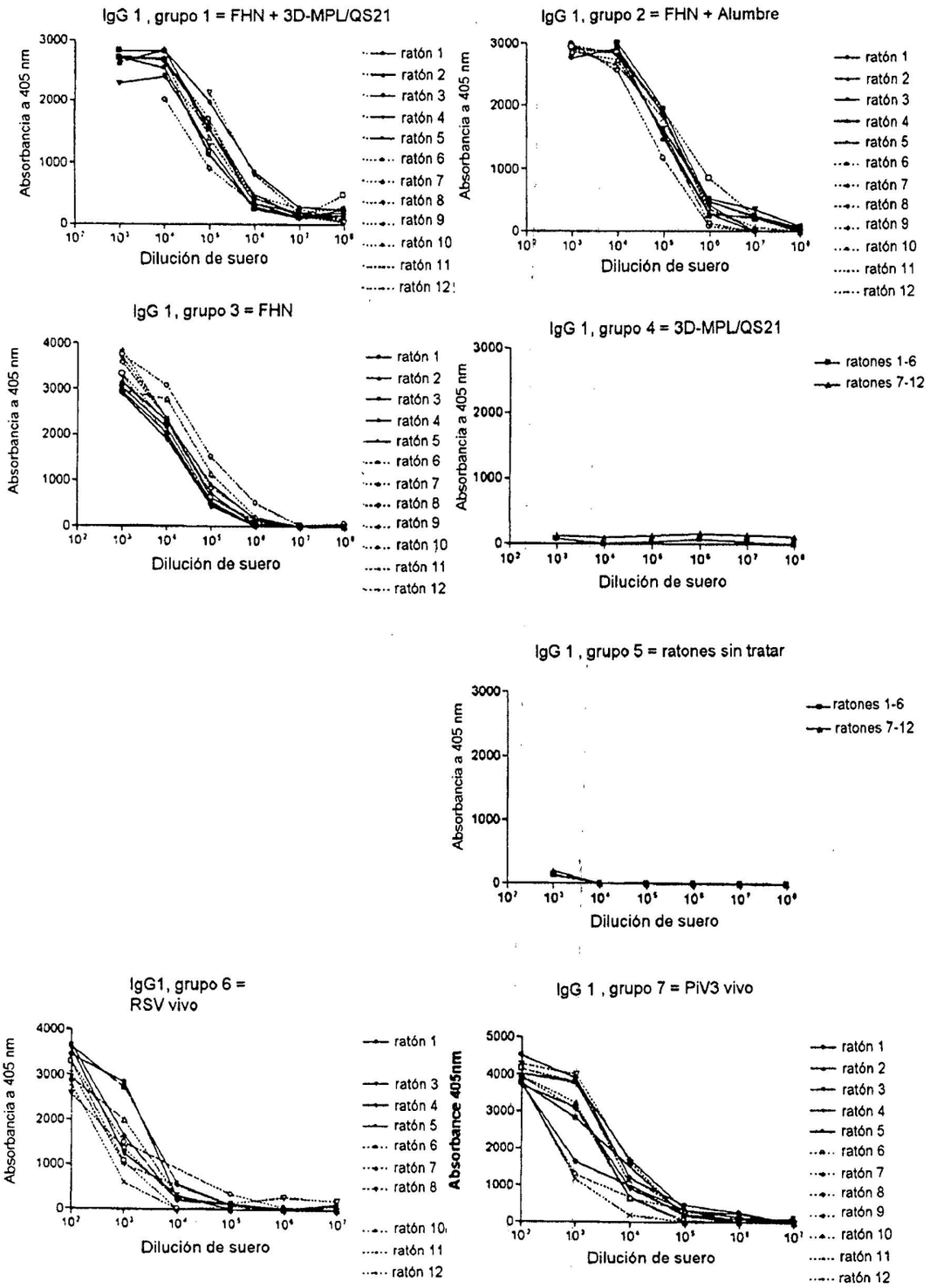
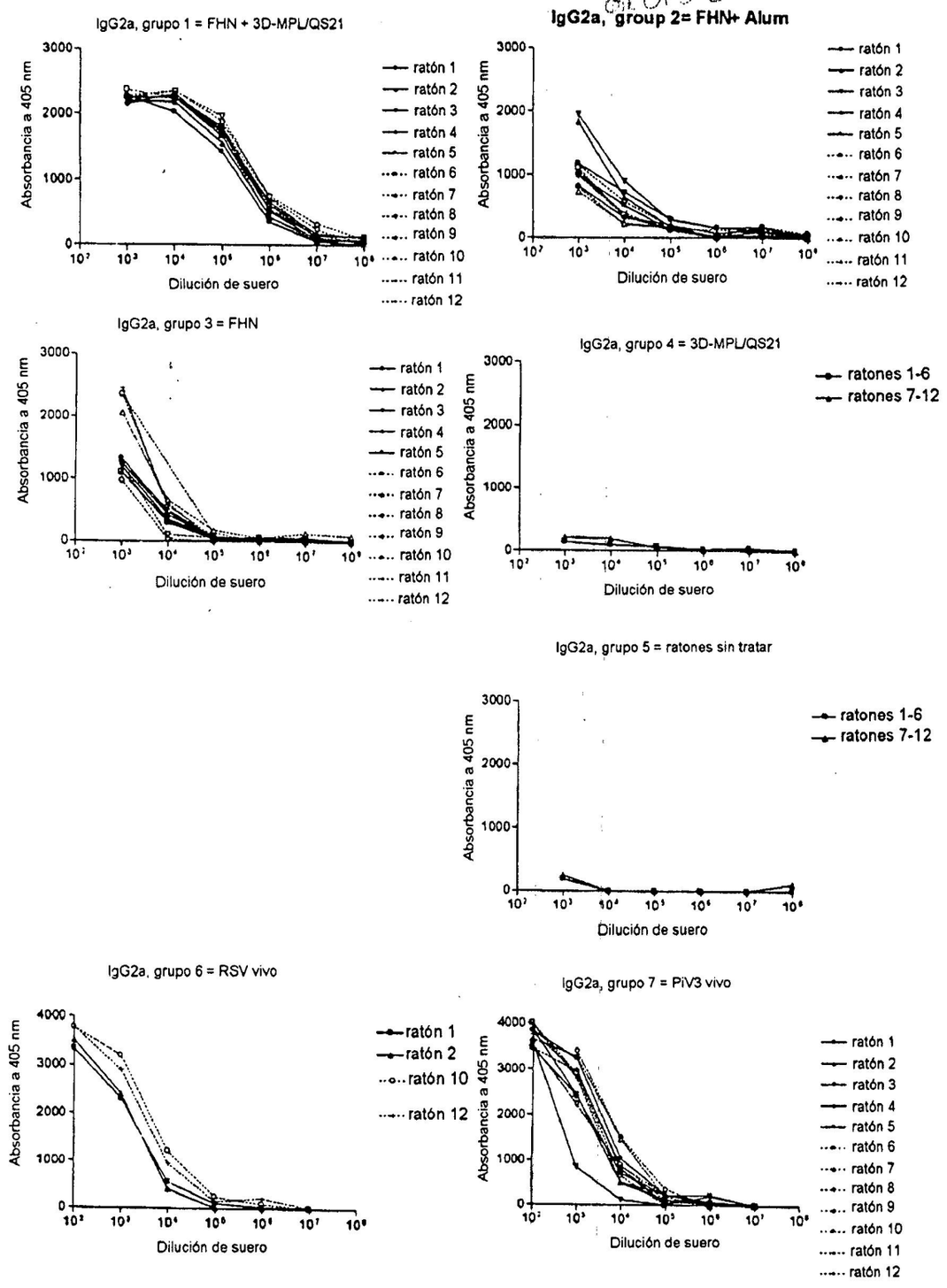


Figura 44: IgG2a dirigida contra la proteína FHN



322

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 325

Radicación no 00-3425

Concepto Técnico no 1462

Clasificación Internacional de Patentes: C07K 14/115, A61K 39/155, C12N 15/62

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [✔] NO [ ]	Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).
SI [✔] NO [ ]	Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).
SI [✔] NO [ ]	Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).
SI [✔] NO [ ]	NO ES APLICABLE [ ] Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)
SI [✔] NO [ ]	Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).
SI [ ] NO [ ]	NO ES APLICABLE [✔] Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).
SI [ ] NO [ ]	NO ES APLICABLE [✔]Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).
SI [ ] NO [✔]	La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).
SI [✔] NO [ ]	La prioridad coincide con la materia reivindicada.
SI [✔] NO [ ]	**CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [ ] NO [✔] ver hoja(s) anexa(s)

Nuevo capítulo descriptivo folios 171 a 243.
Nuevo capítulo reivindicatorio folios 244 a 251
Nuevas figuras folios 253 a 325.

EXAMINADOR TÉCNICO
202016

Bogotá D. C., 2002-09-30

323

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 323 416 2003-04-30

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
GERMÁN CASTILLO GRAU
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación No.	00-3425
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	1972
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, a los 07 OCT. 2002

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Bogotá, DC, 04-03 El extracto de esta solicitud fue publicado en el número 524 de la Gaceta de Propiedad Industrial, de fecha 31-01-03 524
.El término hábil señalado por la ley expiró el 30-04-03 y SI 1
NO X se presentaron oposiciones por parte de terceros.

202016

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

3641

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RADICACIÓN: **0-3425** EDICTO No. **13588**

LA SECRETARÍA GENERAL AD-HOC
HACE SABER:

Que esta Superintendencia profirió **Resolución** No. **22804** de **19-AGO-2003**. Que el contenido de la parte resolutiva es como sigue: El Superintendente de Industria y Comercio.

RESUELVE

ARTICULO PRIMERO: Declarar abandonada la solicitud de privilegio de patente de invención contenida en el expediente de la referencia.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente el contenido de la presente resolución al doctor Germán Castillo Grau, o a quien haga sus veces, quien actúa como apoderado de Smithkline Beecham Biologicals S.A., entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición interpuesto ante el Superintendente de Industria y Comercio, al momento de la notificación o dentro de los 5 días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE
Dada en Bogotá, D.C., a los 19 AGO. 2003

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,

JAIRO ROBLEDO ESCOBAR

Para notificar a los interesados, se fija el presente EDICTO en lugar visible al público en la SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, por el término de (10) diez días hábiles contados a partir de las 8:30 a.m. de hoy.

Secretaría General Ad-Hoc **02-SEP-2003** _____ Este edicto se desfija hoy **15-SEP-2003** a las cinco (5:00 p.m.) _____
Secretaría General Ad-Hoc
EDICTO No. **13588**