



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 241**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99927440 .0**

86 Fecha de presentación : **11.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1098961**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

54 Título: **Virus de influenza A atenuados, y composiciones inmunogénicas y formulaciones de vacunas que los contienen.**

30 Prioridad: **12.06.1998 US 89103 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **Mount Sinai School of Medicine of the
City University of New York
One Gustave L. Levy Place
New York, New York 10029-6574, US
AVIR GREEN HILLS BIOTECHNOLOGY
RESEARCH DEVELOPMENT TRADE AG.**

72 Inventor/es: **Egorov, Andrej Y.;
Muster, Thomas;
Garcia-Sastre, Adolfo;
Palese, Peter y
Brandt, Sabine**

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 301 241 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus de influenza A atenuados, y composiciones inmunogénicas y formulaciones de vacunas que los contienen.

5 El trabajo reflejado en esta solicitud ha sido financiado, en parte, por una subvención del Instituto Nacional de la Salud, y el Gobierno puede tener ciertos derechos en la invención.

1. Introducción

10 La presente invención se refiere a la elaboración de virus influenza A atenuados mediante la alteración de la secuencia de codificación del gen viral N51. En particular, la presente invención se refiere a la preparación de virus influenza A atenuados vivos que inducen el interferón y vías asociadas. La presente invención se refiere además al uso de los virus atenuados y vectores virales contra un amplio espectro de patógenos y/o antígenos, incluidos los antígenos específicos de tumores.

15 2. Antecedentes de la invención

2.1. *Virus atenuados*

20 Las vacunas de virus inactivado se preparan “matando” el patógeno viral, por ejemplo, mediante tratamiento con calor o formalina, para que no pueda replicarse. Las vacunas inactivadas tienen una utilidad limitada debido a que no proporcionan inmunidad de larga duración y, por lo tanto, permiten una protección limitada. Una aproximación alternativa a la producción de vacunas con virus implica el uso de vacunas con virus atenuados vivos. Los virus atenuados son capaces de replicación pero no son patógenos, y, por lo tanto, proporcionan una inmunidad de duración más larga y permiten mayor protección. Sin embargo, los métodos convencionales para producir virus atenuados implica el aislamiento aleatorio de mutantes del rango de huéspedes, muchos de los cuales son sensibles a la temperatura; por ejemplo, el virus atraviesa huéspedes artificiales, y se seleccionan los virus progenie que son inmunogénicos, todavía no patógenos. La tecnología de ADN recombinante así como las técnicas de ingeniería genética, en teoría, permitirían una aproximación superior a la producción de un virus atenuado ya que se podrían preparar deliberadamente mutaciones específicas dentro del genoma viral. Sin embargo, las alteraciones genéticas necesarias para la atenuación de virus no son conocidas o predecibles. En general, los intentos para usar la tecnología de ADN recombinante para elaborar vacunas virales se han dirigido principalmente a la producción de vacunas subunitarias que contienen solamente subunidades de proteínas del patógeno implicado en la respuesta inmune, expresado en vectores virales recombinantes como el virus vaccinia o baculovirus. Más recientemente, se han utilizado técnicas de ADN recombinante en un intento de producir mutantes de delección del virus herpes o poliovirus que imitan los virus atenuados encontrados en la naturaleza o mutantes conocidos del rango de huéspedes. Hasta muy recientemente, los virus de ARN de hebra negativa no respondían bien a la manipulación específica del sitio, y por lo tanto no podían elaborarse genéticamente.

40 2.2. *El virus influenza*

Las familias de virus que contienen ARN envuelto de única hebra del genoma de sentido negativo están clasificadas en dos grupos que tienen genomas no-segmentados (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae) o aquellos que tienen genomas segmentados (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae y Arenaviridae). La familia de Orthomyxoviridae, descrita detalladamente a continuación, y utilizada en los ejemplos aquí, contiene solamente los virus de influenza, tipos A, B y C.

Los viriones de influenza se componen de un núcleo interno de ribonucleoproteína (una nucleocápside helicoidal) que contiene el genoma ARN de única hebra, y una envoltura exterior de lipoproteína recubierta dentro por una proteína matriz (M). El genoma segmentado de influenza A se compone de ocho moléculas (siete para la influenza C) de ARNs lineales, de polaridad negativa, de única hebra que codifican diez polipéptidos, que incluyen: las proteínas de ARN polimerasa ARN dirigidas (PB2, PB1 y PA) y la nucleoproteína (NP) que forma la nucleocápside; las proteínas matrices (M1, M2); dos glicoproteínas superficiales que se proyectan desde la envoltura de lipoproteína: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); y proteínas no-estructurales cuya función es desconocida (NS1 y NS2). La transcripción y replicación del genoma tienen lugar en el núcleo y el ensamblaje ocurre a través de brotes en la membrana plasmática. Los virus pueden re-clasificar los genes durante las infecciones mixtas.

El virus influenza se adsorbe mediante la HA a los sialil-oligosacáridos en las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular. Después de la endocitosis del virión, un cambio conformacional en la molécula de HA tiene lugar dentro del endosoma celular lo que facilita la fusión de la membrana, desencadenando así el escape. La nucleocápside migra hacia el núcleo donde se transcribe el mARN viral como evento inicial esencial en la infección. El mARN viral se transcribe mediante un mecanismo único en el que la endonucleasa viral segmenta el 5'-terminal protegido de los mARN celulares heterólogos que sirven entonces de iniciadores para la transcripción de las plantillas de ARN viral por la transcriptasa viral. Las transcripciones terminan en los sitios 15 a 22 bases desde los extremos de sus plantillas, donde las secuencias de oligo(U) actúan como señales para la adición independiente de la plantilla de tratos poli(A). De las ocho moléculas de mARN virales así producidas, seis son mensajes monocistrónicos que son traducidos directamente en las proteínas que representan la HA, NA, NP y las proteínas polimerasa viral, PB2, PB1 y PA. Las otras dos transcripciones experimentan un empalme, produciendo cada una dos mARN que son traducidos en distintos marcos de lectura para producir M1, M2, NS1 y NS2.

ES 2 301 241 T3

En otras palabras, los ocho mRNA virales codifican para diez proteínas: ocho estructurales y dos no-estructurales. Se muestra en el Cuadro I a continuación un sumario de los genes del virus influenza y sus productos proteicos.

CUADRO I

Segmentos de ARN del Genoma del Virus Influenza y Asignaciones de Codificación

Segmento	Longitud ^b (Nucleótidos)	Polipéptido Codificado	Longitud ^d (Aminoácidos)	Moléculas por Virión	Comentarios
1	2341	PB2	759	30-60	Componente de ARN transcriptasa; unión caperuza ARN de célula huésped.
2	2341	PB1	757	30-60	Componente de ARN transcriptasa; iniciación de la transcripción; ¿Actividad de endonucleasa?
3	2233	PA	716	30-60	Componente de ARN transcriptasa; ¿alargamiento de las cadenas de mRNA?
4	1778	HA	566	500	Hemaglutinina; trímero; glicoproteína de envoltura; media la sujeción a células.
5	1565	NP	498	1000	Nucleoproteína; asociada a ARN; componente estructural de la ARN transcriptasa.
6	1413	NA	454	100	Neuraminidasa; tetrámero; glicoproteína de envoltura.
7	1027	M1	252	3000	Proteína de matriz; líneas dentro de la envoltura.
		M2	96		Proteína estructural en membrana plasmática; mRNA empalmado.
		7	79		Proteína no-identificada.
8	890	NS1	230		Proteína no-estructural; función desconocida.
		NS2	121		Proteína no-estructural; función desconocida; mRNA empalmado.

a Adaptado a partir de R.A. Lamb y P.W. Choppin (1983), Reproducido a partir de la Annual Review of Biochemistry, Volume 52, 467-506.

b Para la cepa A/PR/8/34.

c Determinado por aproximaciones bioquímicas y genéticas.

d Determinado por análisis de secuencias de nucleótidos y secuenciación de proteínas.

El genoma de Influenza A contiene ocho segmentos de ARN de una sola hebra de polaridad negativa, que codifican para nueve proteínas estructurales y una no-estructural. La proteína no-estructural NS1 es abundante en las células infectadas con el virus influenza, pero no ha sido detectada en viriones. NS1 es una fosfoproteína encontrada pronto en el núcleo durante la infección y también en el citoplasma en momento más tardíos del ciclo viral (King y col., 1975, Virology 64:378). Los estudios con mutantes de influenza sensibles a la temperatura (ts) que llevan lesiones en el gen NS sugirieron que la proteína NS1 es un regulador transcripcional y pos-transcripcional de los mecanismos por los que el virus es capaz de inhibir la expresión del gen de las células huésped y estimular la síntesis de las proteínas virales. Como muchas otras proteínas que regulan procesos post-transcripcionales, la proteína NS1 interactúa con las secuencias y estructuras específicas del ARN. Se ha dicho que la proteína NS1 se unía a distintas especies de ARN incluidas: vARN, poli-A, U6 snARN, región no-traducida 5' en cuanto a los mARN virales y ds ARN (Qiu y col., 1995, Rna 1: 304; Qiu y col., 1994, J. Virol. 68: 2425). La expresión de la proteína NS1 procedente del cADN en las células transfectadas ha sido asociada a distintos efectos: inhibición del transporte nucleo-citoplásmico de mARN, inhibición del empalme de pre-mARN; inhibición de la poliadenilación de mARN huésped y estimulación de la traducción del mARN viral (Fortes, y col., 1994, Embo J. 13: 704; Enami, K. y col., 1994, J. Virol. 68: 1432 de la Luna, y col., 1995, J. Virol. 69:2427; Lu, Y. y col., 1994, Genes Dev. 8:1817; Park y col., 1995, J. Biol. Chem. 270, 28433).

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los virus influenza A atenuados vivos genéticamente elaborados que inducen el interferón y respuestas asociadas. La presente invención se refiere a la preparación de virus influenza A atenuados vivos con los segmentos del gen NS suprimidos. El virus influenza A atenuado puede codificar además una secuencia heteróloga, tal como un péptido antigénico viral o un péptido antigénico tumoral. Por ejemplo, el péptido antigénico viral puede ser el virus de inmunodeficiencia humana gp120, el antígeno superficial del virus de la hepatitis B, una glicoproteína del virus del herpes, o el VP1 del virus de la polio. La secuencia heteróloga puede codificar también un gen de inmunoglobulina o una proteína de la misma. La secuencia heteróloga puede proceder de una bacteria, virus o parásito, tal como el epítipo de malaria (ME1) de *Plasmodium yoelii*.

La presente invención se refiere además a vacunas y métodos para inhibir la infección vírica. La vacuna se puede formular para administración intranasal. Los virus atenuados de la presente invención pueden utilizarse para proteger contra la infección vírica. Tal como lo demuestra la evidencia presentada en los Ejemplos presentados, los virus atenuados de la presente invención tienen actividad antiviral cuando se administran antes de la infección con virus de tipo salvaje, demostrando así la utilidad profiláctica de los virus atenuados de la presente invención.

La presente invención se basa en parte, en el descubrimiento sorprendente de los solicitantes de que un virus de influenza A elaborado con el gen NS1 suprimido era capaz de desarrollarse en una línea celular carente de la producción de IFN de tipo 2, pero era indetectable en las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y en la membrana alantoica de los huevos embrionados de pollo, dos sustratos convencionales para el virus de influenza. Los solicitantes descubrieron además que la infección de las células humanas con el virus de influenza A elaborado con el gen NS1 suprimido, pero no el virus de tipo salvaje, inducía altos niveles de expresión de los genes bajo el control del promotor inducido por el IFN. Estos resultados por vez primera tienen en cuenta un sistema de selección eficaz para los virus de influenza que contienen los mutantes de NS1, cuando anteriormente no era posible filtrar los virus con un fenotipo de NS1 suprimido.

Los virus atenuados de la invención se pueden utilizar ventajosamente con seguridad en la formulación de vacunas con virus vivos. Tal como se emplea aquí, el término virus "atenuado" se refiere a un virus que es infeccioso pero no patógeno; o un virus infeccioso que puede ser o no patógeno, pero que produce partículas defectuosas durante cada serie de replicación o produce menos viriones de progenie que lo hacen los virus correspondientes de tipo salvaje durante la replicación. Los virus patógenos que se elaboran para producir partículas defectuosas o un número reducido de viriones de progenie son "atenuados" en lo que aunque el virus sea capaz de causar enfermedad, las concentraciones de virus obtenidas en un individuo vacunado proporcionarán solamente niveles subclínicos de infección.

4. Descripción de las figuras

Fig. 1. Representaciones esquemáticas de los genes NS y mARNs específicos de NS de (A) el virus de influenza A/PR/9/34 de tipo salvaje (WT NS) y (B) virus de influenza de NS1 transfectante. Los segmentos de ARN genómico vienen representados por casillas blancas flanqueadas por cuadrados negros. Los últimos representan las regiones de no-codificación del gen. Los mARN específicos de NS también vienen representados. Unas líneas finas en los extremos de los mARN representan las regiones no-traducidas. Se muestran las estructuras protegidas 5' (círculos negros) y las colas de poli(A) en los mARN. El marco de lectura abierta de la proteína NS1 viene representado por una casilla gris. El marco de lectura abierta de la NEP (Proteína con Exportación Nuclear) específica se muestra con una casilla sombreada. El mARN de la NEP procedente del gen NS de tipo salvaje es un producto empalmado del mARN de NS1, tal como lo indica la línea en forma de V.

Fig. 2. Análisis por RT-PCR del segmento de ARN con NS del virus transfectante de NS1. El ARN viral de NS procedente del virus de influenza A/PR/8/33 purificado (wt) o del virus de de NS1 (de NS1) fue amplificado mediante transcripción inversa acoplada PCR utilizando los iniciadores de oligonucleótidos descritos en la Sección 6. Los productos de PCR se realizaron sobre gel con un 2% de agarosa y se colorearon con bromuro de etidio. Se indican a la derecha las posiciones de seis marcadores.

Fig. 3. Expresión de la proteína en células Vero infectadas por el virus de1NS1 (A) y células MDCK (B). Las células se infectaron con el virus de1NS1 a una MOI de 0,02, se marcaron con [35S] en los puntos de tiempo indicados, y la cantidad total de proteínas virales se inmunoprecipitó utilizando un antisuero policlonal contra el virus de influenza. Se analizaron los productos inmunoprecipitados mediante SDS-PAGE. Las mayores proteínas virales estructurales, la hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA) y proteína matriz (M1) vienen indicadas por flechas. Se muestran a la izquierda los marcadores moleculares de tamaño.

Fig. 4. Expresión de la proteína en las células IFN α R-/- infectadas con el virus de1NS1. Las células fueron infectadas con el virus de1NS1 a una MOI de 0,02, y se marcaron con [35S] en los puntos de tiempo indicados. Como control, células Vero infectadas con el virus de1NS1 se marcaron en el mismo experimento de 8 a 10 horas después de la infección. La cantidad total de proteínas virales fueron inmunoprecipitadas utilizando un antisuero policlonal contra el virus de influenza. Los productos inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE. Las mayores proteínas virales estructurales, la hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA) y proteína matriz (M1) vienen indicadas por flechas. Se muestran a la izquierda los marcadores moleculares de tamaño.

Fig. 5. Inducción de la transcripción desde un promotor estimulado por IFN por infección con el virus de1NS1. Se transfectaron 293 células con el plásmido pHISG54-1-CAT que codifica el gen reportero CAT bajo el control de un promotor estimulado por IFN de tipo I. Un día después de la transfección, se transfectaron las células con 50 μ g de dsARN, o se infectaron con el virus de1NS1 o con el virus A/PR/8/34 influenza de tipo salvaje (wt) a las MOI indicadas. Un día después de la infección, se determinó la actividad de CAT en extractos celulares. Se indica la estimulación de la actividad de CAT después de los distintos tratamientos.

Fig. 6. Inducción de la respuesta antivírica en huevos embrionados por el virus de1NS1. Se inocularon unos huevos de pollo embrionados de 10 días con 20.000 unidades formadoras de placas del virus de1NS1 o con PBS (no-tratado). Después de una incubación de 8 horas a 37°C, se re infectaron los huevos con 103 pfu de virus influenza A/WSN/33 (WSN) de H1N1, virus influenza A/PR/8 (PR8) de H1N1, virus influenza A/X-31 (X-31) de H3N2, virus influenza B/Lee/40 (B-Lee), o virus Sendai (Sendai): Los huevos infectados por B-Lee se incubaron a 35°C durante 40 horas más. Todos los demás huevos se incubaron a 37°C durante 40 horas más. El virus presente en el fluido alantoico fue valorado por el ensayo de hemaglutinación.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a virus influenza A atenuados genéticamente elaborados y a los métodos para su producción. En particular, la presente invención se refiere a la elaboración de virus atenuados vivos con el segmento del gen NS1 suprimido.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de los solicitantes de que un virus elaborado de influenza A con el segmento del gen NS1 suprimido es capaz de desarrollarse en una línea celular carente de la producción de IFN, pero es indetectable en las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y en la membrana alantoica de los huevos embrionados de pollo, dos substratos convencionales para el virus de influenza. Los solicitantes descubrieron además que el virus de influenza A elaborado con el gen NS1 suprimido inducía respuestas al IFN en las células humanas. Los solicitantes descubrieron también que los virus de influenza elaborados con NS1 suprimido son capaces de replicar e inducir la enfermedad en animales que carecen de señalización de IFN, pero no son patógenos en ratones de tipo salvaje.

La presente invención se refiere además a la utilización de los virus atenuados de la presente invención como vacuna contra un amplio espectro de virus y/o antígenos, incluidos los antígenos específicos de los tumores. Se pueden emplear numerosos métodos para introducir las formulaciones de virus atenuados vivos en un ser humano o un animal sujeto a una respuesta inmune.

Estos incluyen, sin limitarse a los mismos las vías oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intranasal. En una realización preferente, los virus atenuados de la presente invención son formulados para su suministro como vacuna intranasal.

5.1. Virus atenuados que inducen respuestas al interferón

Los virus atenuados de influenza A elaborados genéticamente de la presente invención tienen un fenotipo inductor de interferón, en oposición a los virus de tipo salvaje que inhiben las respuestas celulares mediadas por interferón.

La presente invención se refiere a virus atenuados de influenza A con un segmento del gen NS1 suprimido. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento en lo que aunque un virus modificado por NS1 sea capaz de desarrollarse en células carentes de IFN, como las células Vero, su capacidad para replicarse fue seriamente perjudicada en las células MDCK y en los huevos de pollo embrionados. Es posible que estas carencias de crecimiento sean debidas a cambios en los segmentos de ARN distintos del gen NS. Con el fin de descartar esta posibilidad, "se reparó" el virus rescatando un gen NS elaborado de tipo salvaje dentro del virus de1NS1. El virus transfectante resultante se desarrolló hasta niveles de tipo salvaje en las células MDCK y en los huevos, demostrando que la falta del gen NS1 determina las características fenotípicas del virus de1NS1.

Como los virus modificados por NS son capaces de replicación en las células Vero que son carentes de expresión de IFN, esto indica que el crecimiento alterado en el cultivo de tejido y en los huevos de los virus modificados por NS se debe a los efectos mediados por IFN. La siguiente evidencia sostiene el papel de los efectos mediados por IFN: (a) Los niveles de expresión viral de la proteína son similares en las células Vero infectadas por el virus de1NS1 y en las células IFN α R-/-, pero son notablemente reducidos en las células MDCK. Se debe observar que las células IFN α R-/- y las células Vero son ambas defectuosas en la inducción de una respuesta antiviral a IFN, aunque el defecto genético responsable de esta carencia sea distinto para estos dos líneas celulares. (b) Infección con el virus modificado por NS pero no con la transactivación inducida por el virus de tipo salvaje de un gen reportero estimulado por IFN en 293 células. (c) Finalmente, el virus de1NS1 fue capaz de replicar e inducir la enfermedad en ratones que carecían de señalización de IFN, es decir, animales STAT1-/-, pero el virus no era patógeno en ratones de tipo salvaje.

La importancia del IFN de tipo I es ilustrada por el hecho de que numerosos virus expresan antagonistas que contrarrestan las respuestas mediadas por IFN por el huésped. Los ejemplos incluyen los ARN VA de adenovirus, los ARN codificados por el virus Epstein-Barr estructurales pequeños, los productos genéticos K3L y E3L del virus vaccinia, el producto genético NSP3 del rotavirus del grupo C, y la proteína del reovirus $\delta 3$, entre otros. Es interesante que varios de estos productos virales, como la proteína de NS1 del virus de influenza A, sean capaces de unirse a dsARN que impide la activación de PKR. Así, los virus atenuados de la presente invención se pueden utilizar también para complementar cualquier producto terapéutico antiviral en lo que aumenta la respuesta mediada por IFN, una respuesta de que la mayoría de los virus han desarrollado mecanismos complejos para desviarse.

El virus atenuado de influenza de la presente invención se puede utilizar para expresar secuencias heterólogas, incluidos los antígenos virales y tumorales. Así, los virus atenuados se pueden utilizar para expresar una amplia variedad de epítomos antígenos, es decir, que los epítomos que inducen una respuesta protectora inmune a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que unen anticuerpos neutralizantes pueden ser expresados por o como parte de los virus quiméricos. El virus atenuado de la presente invención es un vehículo excelente para introducir epítomos antigénicos dado que induce una respuesta mediada por IFN y no es patógeno al huésped. De acuerdo con la presente invención, la manipulación genética del gen NS de los virus de influenza A puede ayudar a generar vectores virales de vacuna que expresen nuevos antígenos y/o polipéptidos.

Como el segmento de ARN de NS es el más corto entre los ocho ARN virales, es posible que el ARN de NS tolere inserciones más largas de secuencias heterólogas que otros ARN virales. Además, el segmento de ARN de NS dirige la síntesis de altos niveles de proteína en células infectadas, lo que sugiere que sería un segmento ideal para inserciones de antígenos extraños. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquiera de los ocho segmentos de influenza para la inserción de secuencias heterólogas.

Las secuencias heterólogas de codificación genética flanqueadas por el complemento del sitio/promotor de unión de polimerasa viral, por ejemplo, el complemento del terminal del virus 3'-influenza, o los complementos de los terminales del virus tanto 3'- como 5'-influenza, se pueden construir utilizando técnicas conocidas en el arte. Las moléculas de ADN recombinante que contienen estas secuencias híbridas pueden ser clonadas y transcritas por una ARN polimerasa ADN dirigida, como el bacteriófago T7, T3 o la polimerasa Sp6 y similares, para producir plantillas de ARN recombinante que poseen secuencias virales apropiadas que tienen en cuenta el reconocimiento y actividad de la polimerasa viral.

Una aproximación para construir estas moléculas híbridas consiste en insertar la secuencia heteróloga de codificación en un complemento de ADN de un segmento de virus influenza genómico para que la secuencia heteróloga esté flanqueada de las secuencias virales necesarias para la actividad de la polimerasa viral; es decir, el sitio/promotor de unión de la polimerasa, denominado en adelante el sitio de unión de la polimerasa viral. En una aproximación alternativa, los oligonucleótidos que codifican el sitio de unión de la polimerasa viral, por ejemplo, el complemento del terminal-3' o ambos terminales de los segmentos genómicos del virus puede estar ligado a la secuencia heteróloga de codificación para construir la molécula híbrida. La colocación de un gen o segmento extraño de un gen extraño dentro de una secuencia diana ha sido anteriormente dictada por la presencia de sitios adecuados de la enzima de restricción dentro de la secuencia diana. Sin embargo, los recientes avances en biología molecular han reducido mucho este problema. Los sitios de la enzima de restricción se pueden localizar fácilmente en cualquier sitio dentro de una secuencia diana mediante el uso de la mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, véase por ejemplo las técnicas descritas por Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82; 488). Las variaciones en la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita debajo, tienen en cuenta también la inserción específica de las secuencias (es decir, sitio de la enzima de restricción) y tienen en cuenta la fácil construcción de moléculas híbridas. Alternativamente, las reacciones PCR se pueden utilizar para preparar plantillas recombinantes sin necesidad de clonación. Por ejemplo, las reacciones PCR se pueden utilizar para preparar moléculas de ADN de doble hebra que contienen un promotor de ARN polimerasa ADN dirigida (por ejemplo, bacteriofase T3, T7 o Sp6) y la secuencia híbrida que contiene el gen heterólogo y el sitio de unión de la polimerasa viral de influenza. Las plantillas de ARN pueden ser transcritas entonces directamente desde este ADN recombinante. En todavía otra realización, las plantillas de ARN recombinante se pueden preparar ligando los ARN que especifican la polaridad negativa del gen heterólogo y el sitio de unión de la polimerasa viral utilizando una ARN ligasa. Los requisitos de la secuencia para la actividad y construcciones de la polimerasa viral que se pueden utilizar de acuerdo con la invención están descritos en las subsecciones a continuación.

5.2. Generación de virus atenuados

La invención se refiere a virus atenuados de influenza A que han sido modificados de modo tal que resulten en un fenotipo inductor de IFN e independiente de IFN. La sección siguiente describe las distintas aproximaciones que se pueden utilizar de acuerdo con la invención para generar un fenotipo atenuado. Se pueden utilizar técnicas de ADN recombinante para realizar una delección del segmento completo del gen NS1. La invención se basa, en parte, sobre el descubrimiento de que la regulación a la baja del gen NS1 del virus influenza resulta en la producción de partículas defectuosas en cada serie de replicación, para que el virus demuestre características atenuadas.

Se pueden emplear muchos métodos para introducir las formulaciones de virus atenuados vivos en un ser humano o animal sujeto a la inducción de una respuesta inmune; estos incluyen, sin limitarse a los mismos, las vías oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intranasal. Es preferible introducir la vacuna química del virus por su vía natural de infección. Hasta recientemente, los virus de ARN de hebra negativa (por ejemplo, influenza) no respondían a la manipulación genética específica del sitio debido a que los ARN virales no son infecciosos. Sin embargo, una técnica recientemente desarrollada, denominada “genética inversa”, permite la elaboración y producción de virus de ARN recombinante de hebra negativa.

La técnica de la genética inversa implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones de no-codificación del virus de hebra negativa que son esenciales para el reconocimiento de ARN viral por las polimerasas virales y para el empaquetamiento de las señales necesarias para generar un virión maduro. Los ARN recombinantes se sintetizan a partir de una plantilla de ADN recombinante y se reconstituyen *in vitro* con el complejo polimerasa viral purificada para formar ribonucleoproteínas (RNP) recombinantes que se pueden utilizar para transfectar las células. Se realiza una transfección más eficaz si las proteínas de polimerasa viral están presentes durante la transcripción *in vitro* de los ARN sintéticos. Las RNP recombinantes sintéticas se pueden rescatar dentro de partículas de virus infecciosas. Se describen las técnicas precedentes en la patente de los Estados Unidos No. 5.166.057, emitida a 24 de noviembre de 1992 y en Enami & Palese, 1991, J. Virol. 65: 2711-2713, y los virus de influenza A que contienen inserciones, delecciones y mutaciones con la parte del tronco del gen NS, cambios que actúan como mutante del rango de huéspedes.

5.2.1. Alteración de las proteínas virales

Los virus quiméricos atenuados de influenza A que expresan una secuencia heteróloga pueden elaborarse mediante la introducción de una alteración, incluida pero no limitada a una inserción, delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos y/o epítopos en una o más de las proteínas virales implicadas en la regulación a la baja de la respuesta celular mediada por IFN. Esto se puede realizar fácilmente mediante la elaboración de la alteración adecuada dentro de la secuencia del gen viral correspondiente. Cualquier cambio que altere la actividad de la proteína viral implicada en la regulación a la baja de la respuesta celular mediada por IFN para que la replicación viral sea modificada o reducida puede realizarse de acuerdo con la invención.

Por ejemplo, las alteraciones que interfieren en pero que no suprimen completamente la unión viral a los receptores de la célula huésped y subsiguiente infección pueden elaborarse dentro de los antígenos superficiales virales o las proteasas virales implicadas en el procesamiento para producir una cepa atenuada. De acuerdo con esta realización, los antígenos superficiales virales pueden ser modificados para contener inserciones, sustituciones o delecciones de uno o más aminoácidos o epítopos que interfieren en o reducen la afinidad de unión del antígeno viral para los receptores de la célula huésped. Esta aproximación ofrece una ventaja añadida en lo que se puede producir un virus quimérico que expresa un epítipo extraño lo que demuestra también las características atenuadas. Estos virus son candidatos ideales para su uso como vacunas recombinantes vivas. Por ejemplo, las secuencias heterólogas del gen que se pueden elaborar dentro de los virus quiméricos de la invención incluyen, sin limitarse a los mismos, los epítopos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) como gp120; el antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBsAg); las glicoproteínas del virus del herpes (por ejemplo, gD, gE); VP1 del poliovirus; y los determinantes antigénicos de los patógenos no-virales como las bacterias y parásitos por nombrar unos pocos.

A este respecto, el influenza es un sistema ideal en el que elaborar epítopos extraños, porque la capacidad de seleccionar a partir de miles de variantes de virus influenza para construir virus quiméricos evita el problema de la resistencia al huésped o tolerancia inmune encontrado cuando se utilizan otros vectores de virus como el vaccinia. Además, como el influenza estimula una respuesta vigorosa de la célula T citotóxica y secretoria, la presentación de epítopos extraños en el origen del influenza puede también prever la inmunidad secretoria y la inmunidad mediada por la célula. A modo de ejemplo, se puede elaborar la inserción, delección o sustitución de residuos de aminoácidos en la proteína HA del influenza para producir una cepa atenuada. A este respecto, se pueden utilizar alteraciones a la región B o la región E de la HA. De acuerdo con esta aproximación, el epítipo de la malaria (ME 1) de *Plasmodium yoelii* (NEDSYVPSAEQI) se introdujo en el sitio E antigénico de la hemaglutinina del influenza. El virus quimérico resultante tiene un LD50 500 a 1.000 veces más bajo (dosis letal 50) que el del virus de tipo salvaje cuando se somete a ensayo en ratones. En otra realización, el mayor determinante antigénico del tipo 1 de poliovirus, es decir, el bucle BC del VP1 del tipo 1 de poliovirus (PASTTNKDKL) se elaboró en la región B de la proteína de HA del influenza. Este virus quimérico también está atenuado.

En otra realización, se pueden elaborar alteraciones de las proteasas virales necesarias para procesar proteínas virales para producir la atenuación. Las alteraciones que afectan a la actividad enzimática y hacen que la enzima se vuelva menos eficaz en el procesamiento, tendrían que afectar a la infectividad viral, empaquetamiento y/o liberación para producir un virus atenuado. Por ejemplo, se pueden elaborar alteraciones a la proteína de NS del virus influenza para reducir la actividad enzimática de NS y disminuir el número y/o la infectividad del virus progenie liberado durante la replicación.

En otra realización, se pueden alterar las enzimas virales implicadas en la replicación viral y la transcripción de genes virales, por ejemplo, las polimerasas virales, replicasas, helicasas, etc., para que la enzima sea menos eficaz o activa. La reducción de esta actividad enzimática puede resultar en la producción de menos genomas de progenie y/o transcripciones virales para que se produzcan menos partículas infecciosas durante la replicación.

Las alteraciones elaboradas dentro de cualquiera de las enzimas virales incluyen pero no se limitan a inserciones, deleciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos del sitio activo de la molécula. Por ejemplo, el sitio de unión de la enzima podría alterarse para que se reduzca su afinidad de unión para el sustrato, y como consecuencia, la enzima es menos específica y/o eficaz. Por ejemplo, la diana de elección es el complejo de polimerasa viral ya que mutaciones sensibles a la temperatura existen en todas las proteínas de polimerasa. Así, cambios introducidos en las posiciones de aminoácidos asociadas a esta sensibilidad de temperatura se pueden elaborar en el gen polimerasa viral para que se produzca una cepa atenuada.

5.3. Sistema de selección basado en la restricción del huésped

Se proporciona un sistema de selección basado en la restricción del huésped para la identificación de los virus de influenza A genéticamente manipulados. El sistema de selección de forma más particular está asociado a la identificación de virus de influenza A genéticamente manipulados que contienen segmentos modificados del gen NS. El sistema de selección tiene en cuenta el cribado de los virus de influenza genéticamente elaborados para identificar aquellos virus con un segmento modificado del gen NS.

El sistema de selección se basa, en parte, sobre el descubrimiento de los solicitantes de que un virus elaborado de influenza A con el gen NS1 suprimido era capaz de desarrollarse en una línea celular carente de producción de IFN, mientras que la misma línea celular no soportaría la infección y el crecimiento del virus influenza de tipo salvaje. El virus con NS suprimido era incapaz de infectar y desarrollarse en los sustratos convencionales para el virus influenza. Así, se puede utilizar una criba muy sencilla y fácil para identificar aquellos virus de influenza genéticamente elaborados que contienen un gen NS1 modificado.

5.4. Formulaciones de vacunas que utilizan virus quiméricos

Virtualmente, cualquier secuencia heteróloga de gen se puede construir en los virus quiméricos de la invención para su uso en vacunas. Preferentemente, los epítomos que inducen una respuesta protectora inmune a cualquiera de una variedad de patógenos o antígenos que unen anticuerpos neutralizantes pueden ser expresados por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias heterólogas del gen que se pueden construir dentro de los virus quiméricos de la invención para su uso en vacunas incluyen pero no se limitan a los epítomos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) como gp120; el antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBsAg); las glicoproteínas del virus del herpes (por ejemplo, gD, gE); VP1 del poliovirus; determinantes antigénicos de patógenos no-virales tales como las bacterias y parásitos, por nombrar unos pocos. En otra realización, se pueden expresar todos o partes de los genes de inmunoglobulina. Por ejemplo, se pueden construir regiones variables de inmunoglobulinas anti-idiotípicas que imitan estos epítomos dentro de los virus quiméricos de la invención.

Se puede formular una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada. Puede resultar preferible una vacuna viva debido a que la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similares al que ocurre en infecciones naturales, y por lo tanto, confiere una inmunidad sustancial de larga duración. La producción de estas formulaciones de vacunas de virus recombinante vivo se puede realizar utilizando métodos convencionales que implican la propagación del virus en el cultivo celular o en el alantoide del embrión de pollo seguido de la purificación.

A este respecto, el uso del virus influenza genéticamente elaborado (vectores) con un propósito de vacunas puede necesitar la presencia de características de atenuación en estas cepas. Los candidatos actuales de vacunas de virus vivos para su uso en seres humanos se adaptan en frío, son sensibles a la temperatura o pasados para que deriven varios (seis) genes procedentes de virus aviar, lo que resulta en la atenuación. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, deleciones) en las plantillas utilizadas para la transfección puede proporcionar nuevos virus con características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones sin sentido específicas que están asociadas a la sensibilidad a la temperatura o la adaptación al frío pueden transformarse en mutaciones de delección.

Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones de punto asociadas a mutantes sensibles al frío o a la temperatura y las frecuencias de reversión deberían ser extremadamente bajas. Alternativamente, se pueden construir virus quiméricos con características de "suicidio". Estos virus seguirían solamente una o unas pocas series de replicación en el huésped. Por ejemplo, la segmentación de la HA es necesaria para tener en cuenta la reiniciación de la replicación. Por lo tanto, los cambios en el sitio de segmentación de HA pueden producir un virus que se

replica en un sistema celular apropiado pero no en el huésped humano. Cuando se utiliza como vacuna, el virus recombinante seguiría un único ciclo de replicación e induciría un nivel suficiente de respuesta inmune pero no iría más adelante en el huésped humano y provocaría la enfermedad. Los virus recombinantes que carecen de uno o más de los genes esenciales del virus de influenza no serían capaces de experimentar series sucesivas de replicación. Estos virus defectuosos pueden producirse mediante la co-transfección de los RNP reconstituidos que carecen de un gen(es) específico(s) dentro de las líneas celulares que expresan permanentemente este gen(es). Los virus carentes de un gen(es) esencial(es) se replicarán en estas líneas celulares pero cuando se administren al huésped humano no serán capaces de completar una serie de replicación. Estas preparaciones pueden transcribir y traducir -en este ciclo fallido- un número suficiente de genes para inducir una respuesta inmune.

Alternativamente, se podrían administrar cantidades más importantes de cepas, para que estas preparaciones sirvan de vacunas de virus inactivado (matado). En cuanto a las vacunas inactivadas, es preferible que el producto genético heterólogo se exprese como componente viral, para que el producto genético se asocie al virión. La ventaja de estas preparaciones consiste en que contienen proteínas nativas y no experimentan ninguna inactivación por el tratamiento con formalina u otros agentes utilizados en la fabricación de vacunas con virus matado. En otra realización de este aspecto de la invención, se pueden preparar formulaciones de vacuna inactivada mediante la utilización de técnicas convencionales para “matar” los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están “muertas” en el sentido de que su infectividad ha sido destruida. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, se puede cultivar el virus quimérico en cultivo celular o en el alantoide del embrión de pollo, se purifica por ultracentrifugación zonal, se inactiva mediante formaldehído o β -propiolactona, y se agrupa. La vacuna resultante es inoculada normalmente de forma intramuscular.

Los virus inactivados se pueden formular con un adyuvante adecuado para mejorar la respuesta inmunológica. Estos adyuvantes pueden incluir pero no se limitan a los geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias superficiales activas como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones; péptidos; emulsiones aceitosas; y adyuvantes humanos potencialmente útiles como el BCG y el *Corynebacterium parvum*.

Se pueden emplear numerosos métodos para introducir las formulaciones de vacunas descritas anteriormente, estas incluyen pero no se limitan a las vías oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, e intranasal. Puede resultar preferible introducir la formulación de vacuna con virus quimérico por la vía natural de infección del patógeno para el que está diseñada la vacuna. Cuando se utiliza una preparación de vacuna con virus quimérico vivo, puede resultar preferible introducir la formulación por la vía natural de infección por el virus influenza. La capacidad del virus influenza para inducir una respuesta inmune secretoria y celular vigorosa se puede utilizar ventajosamente. Por ejemplo, la infección del tracto respiratorio por los virus quiméricos de influenza puede inducir una fuerte respuesta inmune secretoria, por ejemplo en el sistema urogenital, con protección concomitante contra un agente particular causante de la enfermedad.

6. Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron en las siguientes Secciones 7 a 11.

Virus y células. Se propagó el virus influenza A/PR/8/34 (PR8) en huevos embrionados de pollo de 10 días a 37°C. El virus 25A-1 de influenza A, un virus reasortante que contiene el segmento NS procedente de la cepa adaptada al frío A/Leningrad/134/47/57 y los genes restantes procedentes del virus PR8 (Egorov y col., 1994, Vopr. Virusol. 39:201-205; Shaw y col., 1996, Options for the control of influenza III., Brown, Hampson Webster (Elsevier Science) pp. 433-436) se cultivó en células Vero a 34°C. El virus 25A-1 es ts en células mamíferas, y se usó como virus auxiliar para el rescate del virus transfectante de INS1. Se usaron células Vero y MDCK en el medio mínimo esencial (MEM) que contenía 1 μ g/ml de tripsina (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) para el cultivo del virus influenza. Se utilizaron también las células Vero para la selección, purificación en placas y valoración del virus de INS1. Las células MDCK, 293 células y los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) procedentes de embriones de ratones con IFN α R-/- de 14-16 días se mantuvieron en DMEM (medio mínimo esencial de Dulbecco) que contenía un 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor. Los fibroblastos inmortalizados de IFN α R-/- derivaban de MEF por paso continuo (Todaro y col., 1963, J. Cell. Biol. 17:299-313). Las células Vero se cultivaron en medio AIM-V (Life Technologies, Grand Island, NY).

Ratones. Los ratones C57BL/6 homocigos para una delección diana de STAT1 se generaron tal como se ha descrito anteriormente (Durbin y col., 1996, Cell 84:443-450). Se han descrito también los ratones IFN α R-/- (Hwang y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11284-11288). Se compraron a Taconic Farms ratones exentos de patógenos específicos C57BL/6 y BALB/c (tipo salvaje).

Infecciones de los animales. Se utilizaron ratones hembra para la infección con virus influenza a las 6 a 12 semanas de edad. Se realizaron inoculaciones intranasales (i.n.) en ratones de tipo salvaje y STAT1-/- bajo anestesia con éter utilizando 50 μ l de MEM que contenía 5x10⁴ unidades formadoras de placas (pfu) de virus de INS1. Se controlaron diariamente los animales y se sacrificaron cuando se observaron en un estado “*in extremis*”. Todos los procedimientos estaban acorde con las directrices de NIH sobre el cuidado y utilización de los animales de laboratorio.

Plásmidos. Se elaboró pT3de1NS1 como sigue.

En primer lugar, pPUC19-T3/NS PR8, que contiene el gen NS completo del virus PR8 flanqueado por el promotor ARN polimerasa T3 y el sitio de restricción BpuAI se amplificó mediante PCR inversa (Ochman y col., 1988, Genetics 120:621-623) utilizando los iniciadores 5'-CTGAAAGCTTGACACAGTGTGG-3' y 5'-GACATACTGCTGAGGATGTC-3' (CODON Genetic Systems, Weiden, Austria). El cADN obtenido que carecía por lo tanto del gen NS1 se fosforiló, se trató con Klenow, se autoligó y se propagó en la cepa *E. coli* TG1. La construcción obtenida después de la purificación se denominó pT3de1NS1 y se verificó mediante secuenciación. Los plásmidos para la expresión de las proteínas NP, PB1, PB2 y PA del virus PR8 (pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2, y pHMG-PA) han sido descritos anteriormente (Pleschka y col., 1996, J. Virol. 70:4188-4192). Se realizó pPOLI-NS-RB mediante la sustitución del marco de lectura abierta CAT de pPOLI-CAT-RT (Pleschka y col., 1996, J. Virol. 70:4188-4192) dentro del producto RT-PCR derivado de la región de codificación del gen NS del virus influenza A/WSN/33 (WSN). Este plásmido expresa el segmento de ARN viral específico de NS del virus WSN bajo el control de un promotor de polimerasa I humana truncada. pHISG54-1-CAT (Bluyssen y col., 1994, Eur. J. Biochem. 220:395-402) codifica el gen reportero CAT bajo el control transcripcional del promotor estimulado por IFN α del gen ISG-54K.

Generación de virus transfectantes. La generación del virus de1NS1 se realizó por transfección de la ribonucleoproteína (RNP) (Lutyjies y col., 1989, Cell 59:1107-1113). Las RNP se formaron mediante transcripción de ARN polimerasa T3 a partir de pT3de1NS1 linearizado con BpuAI en presencia de la nucleoproteína purificada y la polimerasa del virus influenza 25A-1 (Enami y col., 1991, J. Virol. 65:2711-2713). Los complejos de RNP se transfectaron en células Vero que estaban previamente infectadas con virus 25A-1. Las células transfectadas se incubaron durante 18 horas a 37°C, se pasó dos veces el sobrenadante por las células Vero a 40°C y se purificó en placas tres veces en las células Vero cubiertas de medios en capa de agar a 37°C. El virus aislado de1NS1 se analizó por RT-PCR utilizando los iniciadores 5'-GGCCTCTAGATAATACGACTCACTATAAGCAAAAGCAGGGTGACAAAG-3' (complementario a las posiciones 1 a 21 del extremo 3' de no-codificación del gen NS) y 5'-GATCGCCTTCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTATTAAA TAAGCTG-3' (que contiene los últimos 38 nucleótidos del extremo 5' de no-codificación del gen NS). El virus transfectante NS/WSN se generó como sigue. Las células Vero en platos de 35 mm se transfectaron con los plásmidos pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA y pPOLI-NS-RB, tal como se ha descrito anteriormente (Pleschka y col., 1996, J. Virol. 70:4188-4192). Dos días después de la transfección, se infectaron las células con 5x10⁴ pfu del virus de1NS1 y se incubaron 2 días más a 37°C. Se pasó el supernatante celular una vez por las células MDCK y dos veces por en huevos embrionados de pollo. Los virus transfectantes fueron clonados por dilución limitante en huevos. El ARN genómico procedente del virus transfectante purificado NS/WSN se analizó por electroforesis en gel de poliácridamida, tal como ha sido descrito anteriormente (Zheng y col., 1996, Virology 217:242-251).

Análisis de la síntesis proteica en virus en células infectadas. Monocapas celulares en platos de 35 mm se infectaron con 2x10⁴ pfu del virus de1NS1. A intervalos después de la infección, se marcaron las células con L-[35S]cisteína y L-[35S]metionina durante los tiempos indicados. Las células marcadas fueron lisadas en 10 mM de tris-HCl (pH de 7.4) que contenía 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, un 10% de glicerol, un 1% de Triton X-100, un 1% de desoxicolato de sodio y un 0,1% de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se inmunoprecipitaron las proteínas por medio de un suero de conejo policlonal con virus antiinfluenza. Se analizaron las proteínas inmunoprecipitadas mediante electroforesis en gel de poliácridamida con SDS al 10% (SDS-PAGE).

Transfecciones con CAT. 293 monocapas celulares en platos de 35 mm se transfectaron con 1 μ g de pHISG54-1-CAT utilizando el reactivo de lipofección DOTAP (Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se incubaron a 37°C. Un día después de la transfección se infectaron las células con el virus de1NS1 o el virus PR8 a las multiplicidades indicadas de infección (MOI). Como controles, unas células fueron infectadas por simulación o transfectadas con 50 μ g de poli(I-C). Después de 1 día más a 37°C, se elaboraron unos extractos celulares y su actividad CAT fue sometida a prueba, tal como se ha descrito (Percy y col., 1994, J. Virol. 68:4486-4492).

7. Ejemplo

Generación del virus transfectante influenza de1NS1 carente del gen NS1

El segmento de ARN viral específico de NS del virus influenza A codifica las proteínas tanto NS1 como NEP (Proteína con Exportación Nuclear). El mARN específico de NS no-empalmado se traduce en la proteína NS1, mientras el ARN empalmado dirige la síntesis de la NEP. Se construyó el plásmido pT3de1NS1 que expresa un gen NS mutado procedente del virus influenza PR8. Este segmento de ARN mutado contiene una delección del marco de lectura abierta específico de NS1 (posiciones nt 57 a 528 del gen NS de PR8 (Baez y col., 1980, Nucleic Acids Res. 8:5845-5858) y por lo tanto codifica solamente la NEP (Fig. 1). La transfección de RNP del gen de1NS1 utilizando el virus auxiliar ts 25A-1 produjo un virus de progenie que era capaz de desarrollarse a 40°C en las células Vero. La amplificación del gen NS del virus rescatado por RT-PCR confirmó la sustitución del gen NS del virus auxiliar por aquel derivado del gen transfectado de1NS1 (Fig. 2).

8. Ejemplo

Propiedades de desarrollo del virus de1NS1 en un cultivo de tejido y huevos

Las propiedades de desarrollo del virus de1NS1 y del virus PR8 de tipo salvaje fueron comparadas en células Vero, células MDCK y huevos embrionados de pollo de 10 días. Las monocapas celulares que contenían aproximadamente 106 de células Vero o MDCK fueron infectadas con el virus de1NS1 o el virus PR8 a una MOI de aproximadamente 0,0005. Después de 4 días de incubación a 37°C utilizando MEM que contenía 1 µg/ml de tripsina, se utilizaron supernatantes en un ensayo de hemaglutinación. Alternativamente, la cavidad alantoica de huevos embrionados de pollo de 10 días se inyectó con 104 pfu del virus de1NS1 o PR8, y la valoración por hemaglutinación en los fluidos alantoicos fue determinada después de 3 días de incubación a 37°C. Tal como se muestra en el Cuadro 2, el virus de1NS1 era capaz de desarrollarse en las células Vero a concentraciones de 16 en comparación con una concentración de 128 para el virus PR8 de tipo salvaje. Sin embargo, la replicación del virus de1NS1 se deterioró seriamente en las células MDCK y en los huevos (las concentraciones de hemaglutinación fueron indetectables en estas muestras).

CUADRO 2

Replicación del Virus de1NS1 en Células de Cultivo de Tejidos y en Huevos

Concentración de Hemaglutinación ¹		
Medios de Cultivo	de1NS1	PR8 de tipo salvaje ²
Células Vero	16	128
Células MDCK	<2	512
Huevos	<2	2.048

¹ Las concentraciones representan la dilución más alta con actividad hemaglutinante.

² Virus influenza A/PR/8/34 de tipo salvaje.

8.1. La delección del gen NS1 es responsable de las propiedades de desarrollo de de1NS1

Con el fin de demostrar que el desarrollo viral deteriorado del virus de1NS1 en las células MDCK y en huevos era debido a la delección del gen NS1 y no a posibles diferencias en otros segmentos de ARN de los virus de1NS1 y PR8, utilizamos el virus de1NS1 como virus auxiliar para rescatar un gen NS de tipo salvaje. Las transfecciones se llevaron a cabo tal como se describe en Materiales y Métodos utilizando un sistema de expresión basado en plásmidos (Pleschka y col., 1996, J. Virol. 70:4188-4192) para el gen NS de tipo salvaje del virus influenza A/WSN/34. La selección de los virus transfectantes NS/WSN se realizó por pasos seriales en células MDCK y huevos. Los análisis por SDS-PAGE del ARN viral purificado procedente del virus NS/WSN confirmaron la longitud de tipo salvaje de su segmento ARN de NS.

El virus transfectante NS/WSN que contenía el segmento ARN de NS derivado del virus WSN y los segmentos restantes procedentes del virus de1NS1 (PR8) era capaz de desarrollarse hasta concentraciones idénticas a las del virus PR8 de tipo salvaje en células MDCK y en huevos embrionados de pollo de 10 días.

8.2. Niveles de expresión de la proteína viral en células Vero y MDCK infectadas por el virus de1NS1

Con el fin de investigar si la deficiencia de las células MDCK de replicación del virus de1NS1 tenía correlación con una disminución en los niveles de expresión de las proteínas virales, se realizaron experimentos de marcado con [35S]. Se infectaron las células MDCK o Vero con el virus de1NS1 a una MOI de 0,02 y se marcaron con L-[35S]cisteína y L-[35S]metionina durante los tiempos indicados. Después del marcado, las proteínas virales se inmunoprecipitaron a partir de extractos celulares y se separaron mediante PAGE (Fig. 3). La cuantificación de la señal 35S indica que aproximadamente 20 veces menos de proteína viral fue sintetizada por las células MDCK infectadas.

8.3. Las células Vero e IFNAR infectadas por el virus de1NS1 tienen niveles similares de expresión proteica viral

La razón por las diferencias entre las células Vero y MDCK para soportar la replicación del virus de1NS1 y la expresión proteica viral puede tener relación con la incapacidad de las células Vero para sintetizar IFN (Desmyter y col., 1968, J. Virol. 2:955-961; Mosca y col., 1986, Mol. Cell. Biol. 6:2279-2283; Diaz y col., 1988, Proc. NeH.

Acad. Sci. USA 85:5259-5263). Con el fin de probar esta hipótesis, se investigó el modelo de expresión proteica viral en una línea celular murina que es incapaz de responder a IFN. Se infectaron células noqueadas de IFN α R con el virus de1NS1 a una MOI de 0,02 y se marcaron tal como se ha descrito anteriormente. Como control, las células Vero infectadas por el virus de1NS1 se marcaron al mismo tiempo de 8 a 10 horas después de la infección. Los niveles de expresión proteica viral eran similares en ambas líneas celulares (Fig. 4), lo que sugiere que el virus de1NS1 es capaz de replicarse en los sistemas carentes de IFN. Se debe tomar nota de que no pudimos investigar la replicación por multiciclos del virus de1NS1 en las células IFN α R debido a que estas células mueren rápidamente en presencia de tripsina, lo que es necesario para la activación viral de la hemaglutinina y la infectividad del virus.

9. Ejemplo

El virus delta NS1 es un inductor potente de las respuestas del interferón

Estimulación de la transcripción a partir de un promotor regulado por IFN mediante infección con el virus transfectante de1NS1. Para investigar si la delección del gen NS1 en el virus de1NS1 resulta en una respuesta mejorada de IFN en las células infectadas, realizamos experimentos de transfección utilizando pHISG54-1-CAT. Este plásmido contiene el gen reportero CAT en frente del promotor estimulado por IFN α del gen ISG-54K (Bluyssen y col., 1994, Eur. J. Biochem. 220:395-402). 293 células fueron transfectadas con pHISG54-1-CAT e infectadas con el virus de1NS1 o el PR8 de tipo salvaje a las MOI indicadas tal como se describe en Material y Métodos. Se comparó la actividad de CAT en los extractos celulares infectados con la actividad en los extractos celulares no-infectados. Como control positivo, la transcripción desde el promotor regulado por IFN fue estimulada mediante poli(I-C). Tal como se muestra en la Fig. 5, la infección a una MOI de 0,05 con el virus de1NS1, pero no con el virus de tipo salvaje, indujo una estimulación de la expresión del gen reportero aproximadamente 6 veces más importante. El virus transfectante carente del gen NS1 por lo tanto estaba deteriorado en su capacidad para inhibir la respuesta de IFN en las 293 células infectadas.

10. Ejemplo

Patogenicidad del virus delta NS1

El virus transfectante de1NS1 es patógeno en los ratones STAT1. Se investigó la capacidad del virus de1NS1 para replicarse y causar la enfermedad en ratones de tipo salvaje y en ratones deficientes en las respuestas de IFN. Con este propósito, 5x10⁴ pfu de virus de1NS1 se utilizó para infectar i.n. tres ratones C57BL/6 mutante que eran homocigos para una delección diana de STAT1, un transactivador que era necesario para la señalización de IFN (Durbin y col., 1996, Cell 84:443-450; Merez y col., 1996, Cell 84:431-442). De tres a cuatro ratones BALB/c y C57BL/6 de tipo salvaje fueron inoculados también con el virus de1NS1. Los ratones STAT1 infectados parecían enfermos al día 3 después de la infección. El día 7 después de la infección, los tres ratones STAT1 infectados murieron (Cuadro 3). Se recuperó el virus de1NS1 de los pulmones de los ratones moribundos STAT1, lo que indicaba que el virus se estaba replicando en estos animales. Sin embargo, todos los ratones infectados de tipo salvaje sobrevivieron a la infección con de1NS1 sin desarrollar síntomas de enfermedad (Cuadro 3).

CUADRO 3

Supervivencia de los ratones después de la infección con virus de1NS1

Ratones	Día después de la infección		
	Día 1	Día 7	Día 14
STAT1-/- C57BL/6	3 de 3	0 de 3	0 de 3
C57BL/6 de tipo salvaje	3 de 3	3 de 3	3 de 3
BALB/c de tipo salvaje	4 de 4	4 de 4	4 de 4

- 1 Ratones bajo anestesia con éter fueron inoculados de forma intranasal con 5x10⁴ pfu del virus de1NS1.

11. Ejemplo

La preinoculación con el virus de1NS1 inhibe la replicación de influenza

5 Con el fin de investigar si la preinoculación con el virus de1NS1 tiene un efecto inhibitorio sobre la infección o replicación del virus influenza de tipo salvaje, se realizó el siguiente experimento.

10 En este estudio se inocularon huevos embrionados de pollo de 10 días con 20.000 pfu del virus de1NS1 o con PBS dentro de la cavidad alantoica. Después de 8 horas de incubación a 37°C, se re infectaron los huevos con 103 pfu de H1N1 influenza A/WSN/33 (WSN); virus H1N1 influenza A/PR/8 (PR8), virus H3N2 influenza A/X-31 (X-31); virus influenza B/Lee/40 (B-Lee) o virus Sendai y se incubaron durante 40 horas más a 37°C, excepto para las células infectadas con B-Lee que fueron incubadas a 35°C. Como se muestra en la Figura 6, los huevos tratados con el virus de1NS1 resultaron en niveles indetectables de infección viral, en comparación con las células no-tratadas, demostrando así la actividad antiviral del virus de1NS1 y su potencial como producto profiláctico y terapéutico antiviral.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus influenza A atenuado genéticamente elaborado, **caracterizado** porque dicho virus comprende un genoma viral en el que está suprimido el segmento completo del gen NS1 (de1NS1).
2. El virus atenuado según la Reivindicación 1, que codifica además una secuencia heteróloga.
- 10 3. El virus atenuado según la Reivindicación 2 en el que la secuencia heteróloga codifica un péptido viral antigénico.
4. El virus atenuado según la Reivindicación 2 en el que la secuencia heteróloga codifica un péptido antigénico tumoral.
- 15 5. El virus atenuado según la Reivindicación 2, **caracterizado** porque la secuencia heteróloga procede de una bacteria, virus o parásito.
6. Una composición inmunogénica que comprende un virus influenza A (de1NS1) según la Reivindicación 1, y un excipiente adecuado farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. La composición inmunogénica según la Reivindicación 6, que se formula para suministro intranasal.
8. Una formulación de vacuna que comprende un virus influenza A atenuado genéticamente elaborado que contiene una delección completa en su segmento del gen NS1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. La formulación de vacuna según la Reivindicación 8 que se formula para suministro intranasal.
10. La formulación de vacuna según la Reivindicación 8, **caracterizada** porque el virus influenza A atenuado genéticamente elaborado es un virus quimérico que expresa una secuencia heteróloga.
- 30 11. La formulación de vacuna según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque la secuencia heteróloga codifica un antígeno viral.
12. La formulación de vacuna según la Reivindicación 11, **caracterizada** porque el antígeno viral es el virus de inmunodeficiencia humana gp120, el antígeno superficial del virus de la hepatitis B, una glicoproteína del virus del herpes o el VP1 de polivirus.
- 35 13. La formulación de vacuna según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque la secuencia heteróloga codifica un antígeno tumoral.
- 40 14. La formulación de vacuna según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque la secuencia heteróloga deriva de una bacteria, virus o parásito.
15. La formulación de vacuna según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque la secuencia heteróloga codifica un gen de inmunoglobulina o una parte del mismo.
- 45 16. La formulación de vacuna según la Reivindicación 10, **caracterizada** porque la secuencia heteróloga es el epítipo de la malaria (ME 1) de *Plasmodium yoelii*.
17. La formulación de vacuna según la Reivindicación 10 que se formula como vacuna intranasal.
- 50 18. El uso de la formulación inmunogénica según la Reivindicación 6 ó 7 para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un sujeto.
19. El uso de la formulación de vacuna según la Reivindicación 8, 9, 10 ó 17 para la fabricación de un medicamento para vacunar a un sujeto.
- 55 20. El uso según la Reivindicación 18 ó 19, **caracterizado** porque el sujeto es un animal.
21. El uso según la Reivindicación 18 ó 19, **caracterizado** porque el sujeto es un ser humano.
- 60 22. El uso según la Reivindicación 19, **caracterizado** porque el medicamento fabricado es adecuado para administración intranasal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea.

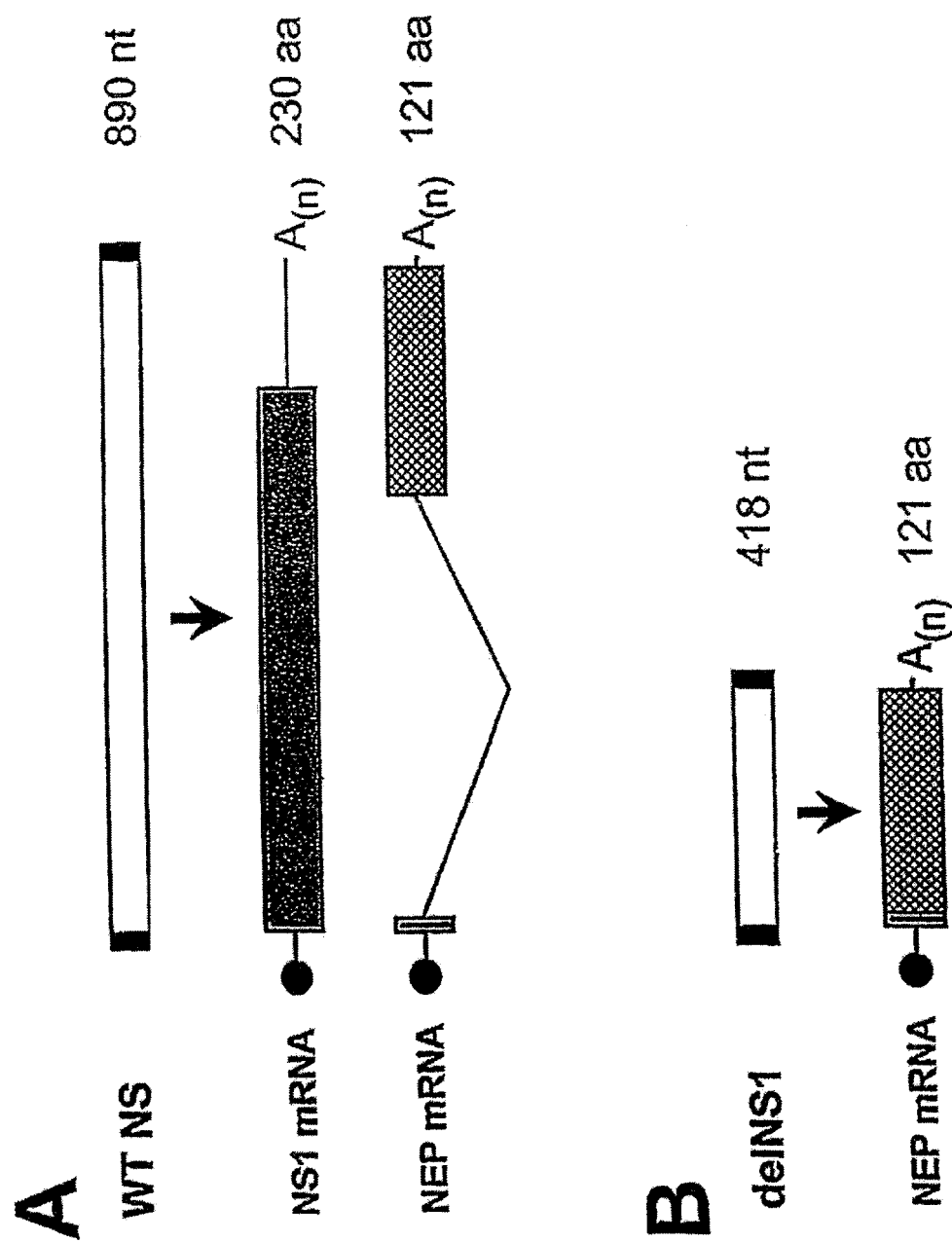


FIG. 1

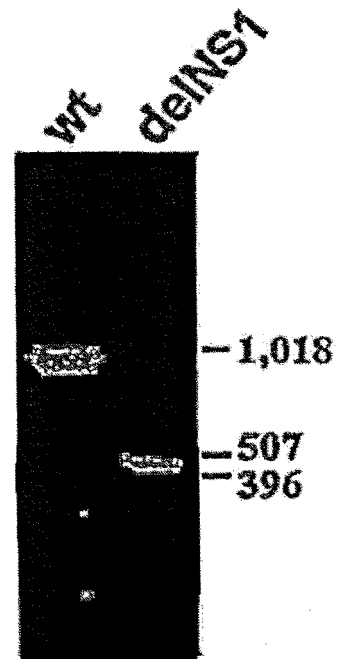


FIG. 2

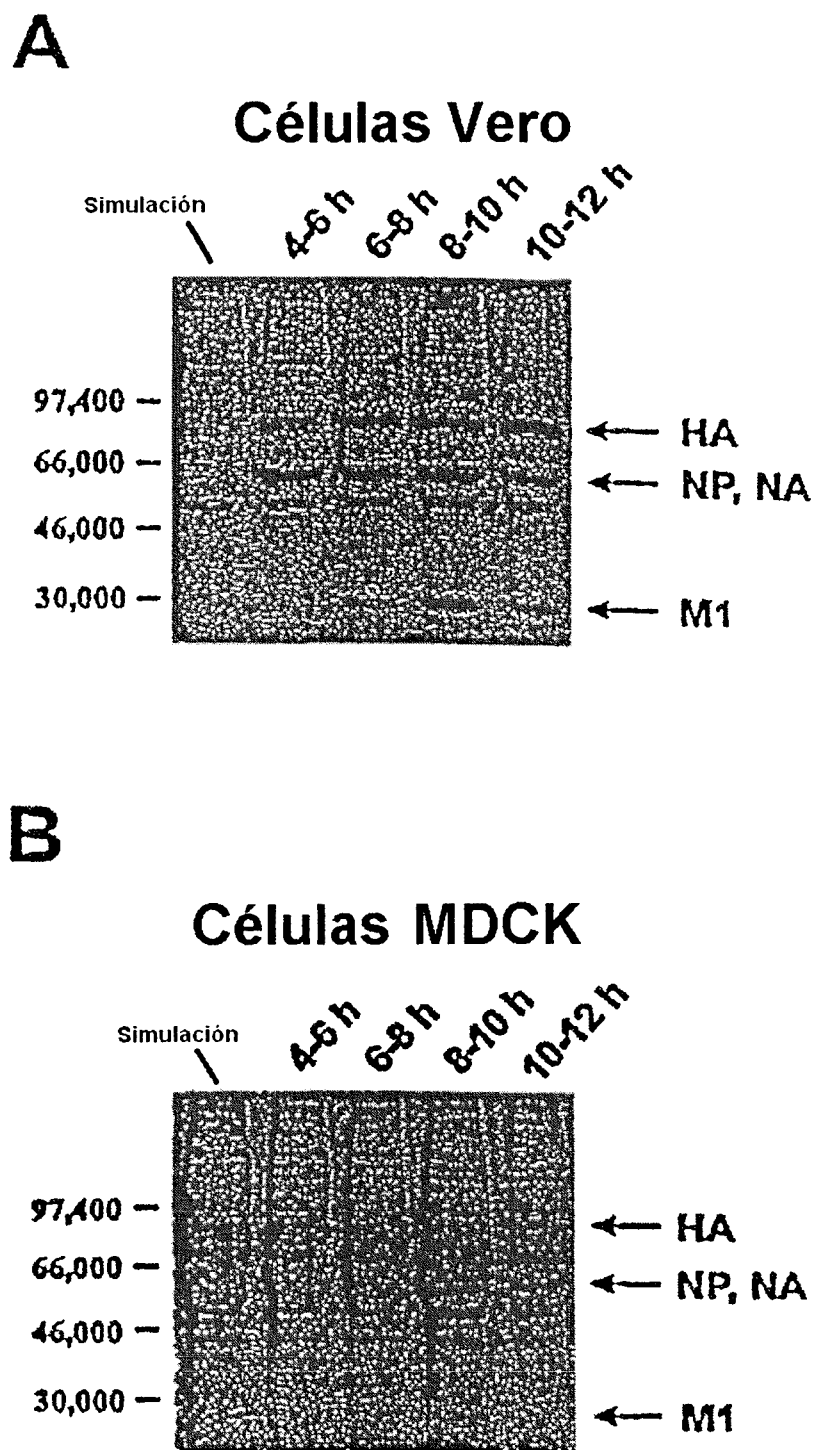


FIG. 3

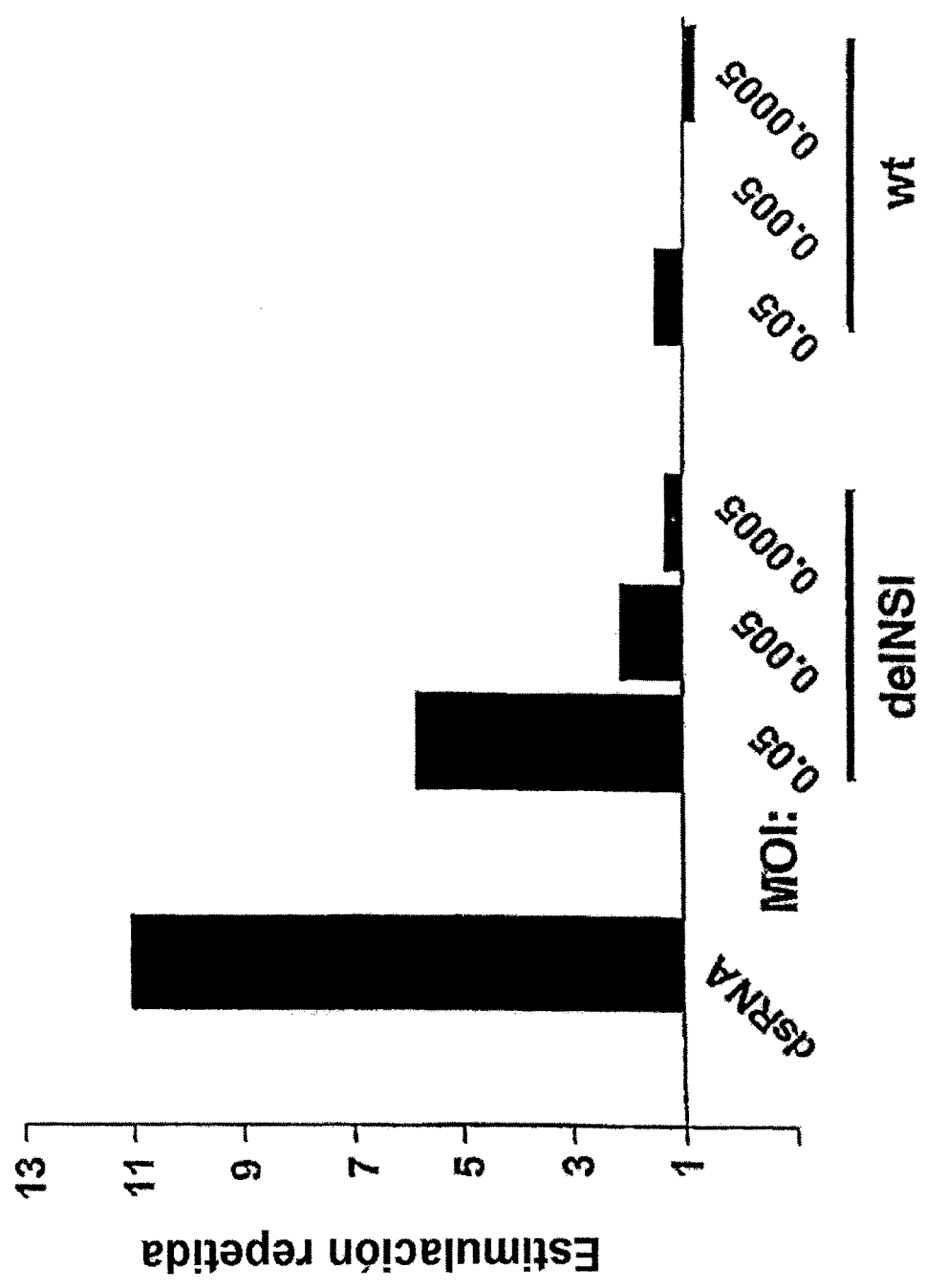


FIG. 4

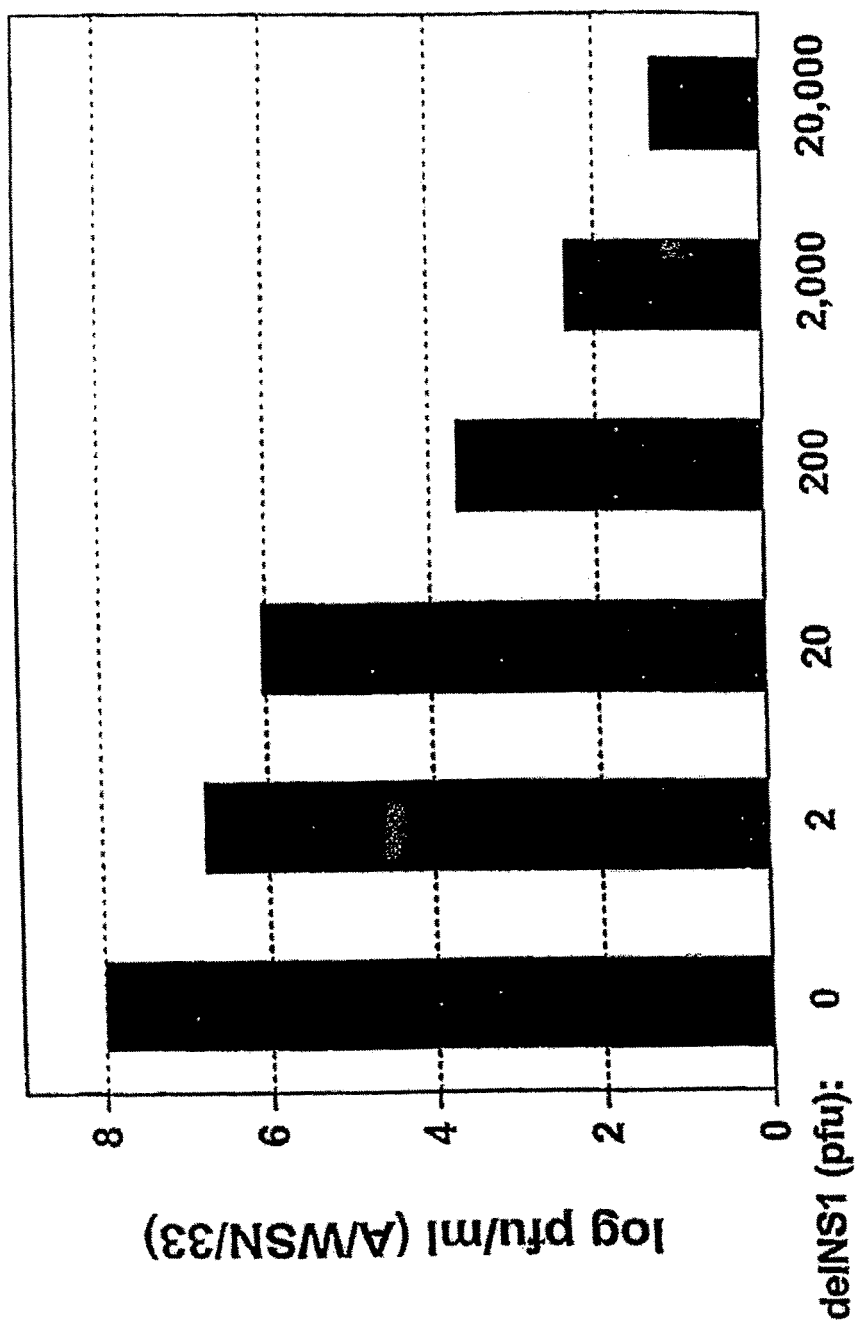


FIG. 5

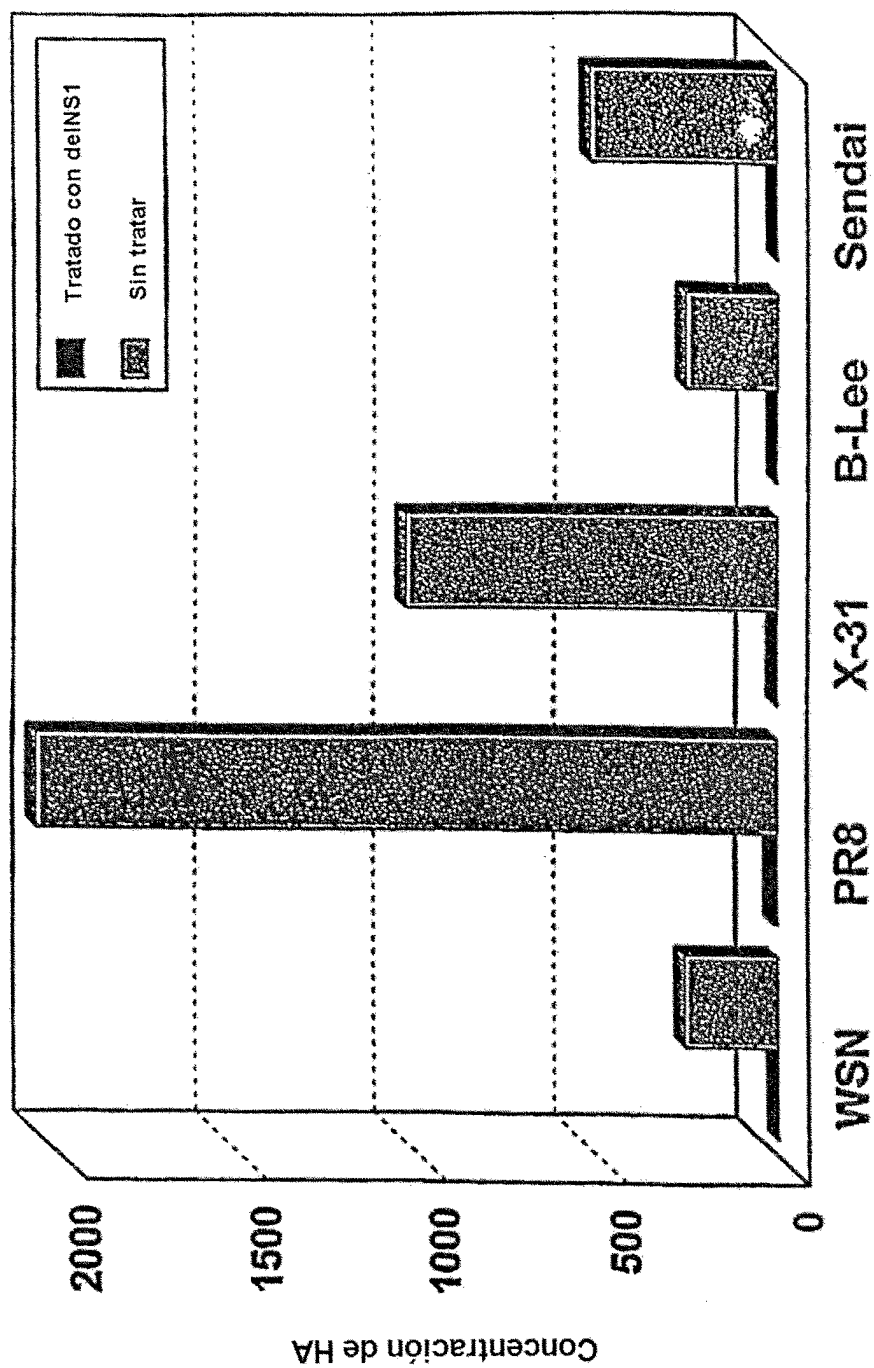


FIG. 6

ES 2 301 241 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Escuela de Medicina Monte Sinaí de la ciudad universitaria de Nueva York	
5	<120> Virus atenuados interferón-inducidos obtenidos por ingeniería genética	
	<130> M 4404EU	
10	<140> EP 99927440.0	
	<141> 1999-06-11	
	<150> 60/089.103	
15	<151> 1998-06-12	
	<160> 5	
20	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 23	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 1	
35	ctgaagctt gacacagtgt ttg	23
	<210> 2	
	<211> 20	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 2	
50	gacatactgc tgaggatgtc	20
	<210> 3	
	<211> 48	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador	
	<400> 3	
65	ggcctctaga taatagcact cactataagc aaaagcaggg tgacaaaag	48

ES 2 301 241 T3

<210> 4
<211> 48
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador
10 <400> 4

gatcgccctc tattagtaga aacaagggtg ttttattaa ataagctg
15
<210> 5
<211> 10
<212> Proteína
20 <213> tipo Poliovirus (VP1)

<400> 5

Pro Ala Ser Thr Thr Asn Lys Asp Lys Leu
1 5 10

30

35

40

45

50

55

60

65