



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0410702-0 B1



(22) Data do Depósito: 27/05/2004

(45) Data de Concessão: 12/04/2022

(54) Título: COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA PREPARAR UM VÍRUS DE INFLUENZA E UM VEÍCULO DE LIBERAÇÃO DE GENES, E, VÍRUS

(51) Int.Cl.: A61K 39/08.

(30) Prioridade Unionista: 28/05/2003 US 60/473,798.

(73) Titular(es): WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION.

(72) Inventor(es): YOSHIHIRO KAWAOKA.

(86) Pedido PCT: PCT US2004016680 de 27/05/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/112831 de 29/12/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/11/2005

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA PREPARAR UM VÍRUS DE INFLUENZA E UM VEÍCULO DE LIBERAÇÃO DE GENES, E PARA IMUNIZAR UM INDIVÍDUO CONTRA UM PATÓGENO, VÍRUS, CÉLULA, E, VETOR. A invenção provê uma composição utilizável para preparar vírus de influenza de título elevado, por exemplo na ausência de vírus auxiliar, que inclui uma seqüência de um isolado de vírus de influenza de título elevado.

“COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA PREPARAR UM VÍRUS DE INFLUENZA E UM VEÍCULO DE LIBERAÇÃO DE GENES, E, VÍRUS”

Referência cruzada a pedidos relacionados

[0001] O presente pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. § 119 (e) de data de depósito do pedido US número de série 60/473.798, depositado em 28 de maio de 2003, cuja descrição é aqui incorporada por referência.

Declaração de Direitos Governamentais

[0002] Esta invenção foi feita com uma bolsa do Governo dos Estados Unidos da América (bolsa AI-47446 do National Institute of Allergy and Infectious Diseases Public Health Service). O Governo tem determinados direitos sobre esta invenção.

Antecedente da Invenção

[0003] Vírus de RNA de sentido negativo são classificados em sete famílias (*Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, e *Arenaviridae*) que incluem patógenos humanos comuns, como vírus sincicial respiratório, vírus de influenza, vírus de sarampo, e vírus Ebola, assim como vírus de animais com impacto econômico grande em indústrias de aves e gado (por exemplo vírus de doença de Newcastle e vírus de Rinderpest). As primeiras quatro famílias são caracterizadas por genomas não segmentados, enquanto as últimas três tem genomas compostos de seis a oito, três ou dois segmentos de RNA de sentido negativo, respectivamente. O aspecto comum de vírus de RNA de sentido negativo é a polaridade negativa e, assim, não é infeccioso sozinho. A fim de iniciar a transcrição e replicação viral, o vRNA precisa ser transcrito em um cRNA ou mRNA de sentido mais, respectivamente, pelo complexo de polimerase viral e a nucleo-proteína; ou vírus de influenza A, o complexo de polimerase viral é composto de três proteínas de polimerase PB2, PB1 e PA. Durante a replicação viral, cRNA serve como um gabarito para a síntese de

novas moléculas de vRNA. Para todos os vírus de RNA de filamento negativo, as regiões de não codificação em ambos os terminos 5' e 3' do vRNA e cRNA são críticos para a transcrição e replicação do genoma viral. Diferentes de transcritos de mRNA viral ou celular, tanto cRNA como vRNA não são nem terminados na extremidade 5' nem poliadenilados na própria extremidade 3'.

[0004] As funções básicas de muitas proteínas virais foram elucidadas bioquimicamente e/ou no contexto da infecção viral. No entanto, sistemas genéticos reversos aumentaram dramaticamente o conhecimento dos requerentes sobre vírus de RNA não segmentos e segmentados de filamento negativo com relação a sua replicação viral e patogenicidade, assim como o desenvolvimento de vacinas de vírus atenuados vivos. A genética reversa, como o termo é usado em virologia molecular, é definida como a geração de vírus possuindo um genoma derivado de cDNAs clonados (para um estudo, ver Neumann et al., 2002).

[0005] A fim de iniciar a replicação viral de vírus de RNA de filamento negativo, vRNA(s) ou cRNA(s) devem ser co-expressados com o complexo de polimerase e a nucleo-proteína. O vírus da raiva foi o primeiro vírus RNA de sentido negativo, não segmentado, que foi gerado completamente a partir de cDNA clonado: Schnell et al. (1994) geraram vírus da raiva recombinante por co-transfecção de uma construção de cDNA codificando o cRNA de comprimento completo e construções de expressão de proteína para as proteínas L, P e N, todas sob o controle de promotor de T7 RNA polimerase. A infecção com vírus de vacínia recombinante, que proveu a T7 RNA polimerase, resultou na geração de vírus de raiva infeccioso. Neste sistema de T7 polimerase, a transcrição primária de cRNA de comprimento completo sob o controle de T7 RNA polimerase resultou em um transcrito de cRNA não terminado. No entanto, três nucleotídeos de guanidina, que formam a sequência de iniciação ótima para T7 RNA polimerase, foram

fixados na extremidade 5'. A fim de criar uma extremidade 3' autêntica do transcrito de cRNA, que é essencial para um ciclo infectivo produtivo, a sequência de ribozima delta de hepatite (HDVRz) foi usada para uma clivagem autocatalítica exata na extremidade 3' do transcrito de cRNA.

[0006] Desde o relatório inicial por Schnell et al. (1994), os sistemas genéticos reversos usando técnicas similares levaram à geração de muitos vírus de RNA de filamento negativo não segmentados (Conzelmann, 1996; Conzelmann, 1998; Conzelmann et al., 1996; Marriott et al., 1999; Munoz et al., 2000; Nagai, 1999; Neumann et al., 2002; Roberts et al., 1998; Rose, 1996). Os aperfeiçoamentos do procedimento de resgate original incluíam a expressão de T7 RNA polimerase a partir de linhagens de células transfectadas de modo estável (Radecke et al., 1996) ou de plasmídeos de expressão de proteína (Lawson et al., 1995), ou procedimentos de choque térmico para aumentar as eficácias de resgate (Parks et al., 1999). Com base no sistema de T7 polimerase, Bridgen e Elliott (1996) criaram o vírus Bunyamwera (família *Bunyaviridae*) a partir de cDNAs clonados e demonstraram a possibilidade de gerar artificialmente um vírus RNA sentido negativo segmentado pelo sistema de T7 polimerase.

[0007] Em 1999, uma técnica de genética reversa à base de plasmídeo foi gerada com base em RNA polimerase I celular para a geração de vírus de influenza A segmentado a partir de cDNAs clonados (Fodor et al., 1999; Neumann e Kawaoka, 1999). RNA polimerase I, uma enzima nuclear, sintetiza RNA ribossômico que, como o RNA de vírus de influenza, não contém capa 5' ou estruturas polyA 3'. A transcrição de RNA polimerase I de uma construção contendo um cDNA viral de influenza, flanqueado por promotor de RNA polimerase I e sequências de terminador, resultou em síntese de vRNA de influenza (Fodor et al., 1999; Neumann e Kawaoka, 1999; Neumann e Kawaoka, 2001; Pekosz et al., 1999). O sistema foi altamente eficiente, produzindo mais que 10^8 partículas de vírus infeccioso

por ml de sobrenadante de células transfectadas com plasmídeos 48 horas após a transfecção.

[0008] O que é necessário é um método para preparar ortomixovírus de título elevado como vírus de influenza A, completamente a partir de cDNAs clonados.

Sumário da Invenção

[0009] A invenção provê uma molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada (polinucleotídeo) codificando pelo menos uma das proteínas de título elevado, por exemplo títulos maiores do que 10^9 /ml, por exemplo maiores do que 10^{10} /ml, vírus de influenza, ou uma porção do mesmo, ou o complemento da molécula de ácido nucleico. Em uma forma de realização, a molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada codifica HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M ou NS, ou uma porção do mesmo, tendo substancialmente a mesma atividade como um polipeptídeo correspondente codificado por uma dentre SEQ ID NO: 1-8. Como usado aqui, “substancialmente a mesma atividade”, inclui uma atividade que é cerca de 0,1%, 1%, 10%, 30%, 50%, 90%, por exemplo, até 100% ou mais, ou o nível de proteína detectável que é cerca de 80%, 90% ou mais, a atividade ou nível de proteína, respectivamente, do polipeptídeo de comprimento completo correspondente. Em uma forma de realização, a molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada codifica um polipeptídeo que é substancialmente o mesmo que, por exemplo, tendo pelo menos 80%, por exemplo, 90%, 92%, 95%, 97% ou 99%, de identidade de sequência de aminoácido contígua para um polipeptídeo codificado por uma dentre SEQ ID NO: 1-8. Em uma forma de realização, a molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada compreende uma sequência de nucleotídeo que é substancialmente igual que, por exemplo tendo pelo menos 50%, por exemplo, 60%, 70%, 80% ou 90% ou mais de identidade de sequência de ácido nucleico contíguo para, uma dentre SEQ ID NO: 1-8, ou o complemento da mesma, e em uma forma de realização,

também codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, por exemplo, 90%, 92%, 95%, 97% ou 99%, de identidade de sequência de aminoácido contígua, para um polipeptídeo codificado por uma dentre SEQ ID NO: 1-8. Em uma forma de realização, a molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada codifica um polipeptídeo com uma ou mais, por exemplo 2, 5, 10, 15, 20 ou mais, substituições de aminoácidos conservativos, por exemplo substituição conservativas de até 10% ou 20% dos resíduos, com relação a um polipeptídeo codificado por uma dentre SEQ ID NO: 1-8. “As substituições de aminoácido conservativas se referem a inter-permutabilidade dos resíduos tendo cadeias laterais similares. Por exemplo, um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais hidroxila alifáticas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais contendo amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos tendo cadeia lateral contendo enxofre é cisteína e metionina. Os grupos de substituição de aminoácido conservativos, preferidos, são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina- tirosina, lisina- arginina; alanina- valina; glutâmico- aspártico; e asparagina- glutamina.

[00010] Em outra forma de realização, a molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada da invenção ou o complemento da mesma, hibridiza para um dentre SEQ ID NO: 1-8, ou o complemento da mesma, sob condições de baixa estrigência, estrigência moderada ou estrigentes. Por exemplo, as seguintes condições podem ser empregadas: 7% de sulfato dodecil de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50 °C com lavagem em 2X SSC, 0,1% de SDS a 50 °C (estrigência baixa), mais desejável em 7% de sulfato dodecil de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50 °C com lavagem em 1X de SSC, 0,1% de SDS a 50 °C (estrigência moderada), mais

desejável ainda em 7% de sulfato dodecil de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50 °C com lavagem em 0,5% SSC, 0,1% de SDS a 50 °C (estringente), preferivelmente em 7% de sulfato dodecil de sódio (SDA), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50 °C com lavagem em 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 50 °C (mas estringente), mais preferivelmente em 7% de sulfato dodecil de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50 °C com lavagem em 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 65 °C (muito estringente). Em uma forma de realização, a molécula de ácido nucleico da invenção codifica um polipeptídeo que é substancialmente o mesmo como, por exemplo, tendo pelo menos 50%, por exemplo, 60%, 70%, 80% ou 90% ou mais de identidade de sequência de ácido nucleico contígua para uma dentre SEQ ID NO: 1-8, e preferivelmente tem substancialmente a mesma atividade como um polipeptídeo de comprimento completo correspondente codificado por uma dentre SEQ ID NO: 1-8.

[00011] A molécula de ácido nucleico da invenção pode ser empregada para expressar proteínas de influenza, para preparar genes quiméricos, por exemplo, com outros genes virais incluindo genes de vírus de influenza, e/ou para preparar vírus recombinantes. Assim, a invenção também provê polipeptídeos isolados, vírus recombinantes e células hospedeiras contactadas com as moléculas de ácido nucleico ou vírus recombinante da invenção.

[00012] A invenção também provê pelo menos um dos seguintes vetores isolados e/ou purificados: um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PA de vírus influenza para uma sequência de terminação de transcrição; um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB2 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de

HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de vírus de influenza NS ligado a uma sequência de terminação de transcrição, em que pelo menos um vetor compreende sequências codificando HA, NA, PB1, PB2, PA, NP, M, NS, ou uma porção das mesmas, tendo substancialmente a mesma atividade que um polipeptídeo correspondente codificado por uma dente SEQ ID NO: 1-8, por exemplo uma sequência codificando um polipeptídeo com pelo menos 80% de identidade de aminoácido para um polipeptídeo codificado por uma dente SEQ ID NO: 1-8. Opcionalmente, dois vetores podem ser empregados em vez do vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, por exemplo um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de vírus de influenza M1 ligado a uma sequência de terminação de transcrição, e um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de vírus de influenza M2 ligado a uma sequência de terminação de transcrição.

[00013] A invenção provê vetores isolados e purificados ou plasmídeos, que expressam ou codificam proteínas de vírus de influenza, ou expressam ou codificam vRNA de influenza, tanto vRNA nativo como recombinante. Preferivelmente, os vetores compreendendo cDNA de influenza, por exemplo influenza A (por exemplo qualquer gene de influenza A incluindo qualquer um dos subtipos 15 HA ou 9 NA), B ou C DNA (ver

capítulos 45 e 46 de Fields Virology (Fields et al. (eds.), Lippincott-Raven Publ. Philadelphia, PA (1996), que são especificamente incorporados aqui por referência), apesar de ser visado que o(s) gene(s) de qualquer organismo pode ser empregado nos vetores ou métodos da invenção. O cDNA pode estar em orientação sentido ou anti-sentido com relação ao promotor. Assim, um vetor da invenção pode codificar uma proteína de vírus de influenza (sentido) ou vRNA (anti-sentido). Qualquer promotor apropriado ou sequência de terminação de transcrição pode ser empregado para expressar uma proteína ou peptídeo, por exemplo uma proteína viral ou peptídeo, uma proteína ou peptídeo de um patógeno não viral, ou uma proteína ou peptídeo terapêutico.

[00014] A invenção provê uma composição compreendendo uma pluralidade de vetores de vírus de influenza da invenção. Em uma forma de realização da invenção, a composição compreende: a) pelo menos dois vetores selecionados dentre um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB2 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, e um vetor compreendendo um promotor ligado de modo

operativo a um cDNA de vírus de influenza NS ligado a uma sequência de terminação de transcrição, em que pelo menos um vetor compreende um promotor ligado de modo operativo a uma molécula de ácido nucleico da invenção ligado a uma sequência de terminação de transcrição, e b) pelo menos dois vetores selecionados dentre um vetor codificando PA de vírus influenza, um vetor codificando PB1 de vírus influenza, um vetor codificando PB2 de vírus influenza, e um vetor codificando NP de vírus influenza. Opcionalmente, os vetores de b) incluem um ou mais vetores codificando NP, NS, M, por exemplo M1 e M2, HA ou NA. Preferivelmente, os vetores codificando proteínas virais ainda compreendem uma sequência de terminação de transcrição.

[00015] Em outra forma de realização, a composição compreende a) pelo menos dois vetores selecionados dentre um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição; um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB2 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NA de vírus influenza e NB ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um ligado de modo operativo a um cDNA de vírus de influenza NS ligado a uma

sequência de terminação de transcrição, e um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de vírus de influenza BM2 ligado de modo operativo a uma sequência de transcrição, em que pelo menos um vetor compreende um promotor ligado de modo operativo a uma molécula de ácido nucleico da invenção ligado a uma sequência de terminação de transcrição, e b) pelo menos dois vetores selecionados dentre um vetor codificando PA de vírus influenza, um vetor codificando PB1 de vírus influenza, um vetor codificando PB2 de vírus influenza, e um vetor codificando NP de vírus influenza. Opcionalmente, os vetores de b) incluem um ou mais vetores codificando NP, NS, M, HA ou NA. Preferivelmente, os vetores codificando as proteínas virais ainda compreendem uma sequência de terminação de transcrição.

[00016] Uma composição da invenção também pode compreender um gene ou uma matriz de interesse, por exemplo um gene estranho codificando um peptídeo ou proteína imunogênico utilizável como uma vacina. Assim, outra forma de realização da invenção compreende uma composição da invenção como acima mencionado em que um dos vetores é substituído com, ou a composição ainda compreende, um vetor compreendendo um promotor ligado a sequências de vírus de influenza 5' opcionalmente incluindo sequências de codificação de vírus de influenza 5' ou uma porção das mesmas, ligadas a uma sequência de ácido nucleico desejada por exemplo um cDNA desejado, ligado a sequências de vírus de influenza 3' opcionalmente incluindo sequências de codificação de vírus de influenza 3' ou uma porção das mesmas, ligadas a uma sequência de terminação de transcrição. Preferivelmente, a sequência de ácido nucleico desejada como cDNA está em uma orientação anti-sentido. A introdução desta composição a uma célula hospedeira permissiva para replicação de vírus resulta em vírus recombinante compreendendo vRNA correspondendo a sequências do vetor. O promotor em tal vetor para a produção de vRNA pode ser um promotor de RNA polimerase

I, um promotor de RNA polimerase II, um promotor de RNA polimerase III, um promotor T7, e um promotor T3, e opcionalmente o vetor compreende uma sequência de terminação de transcrição como uma sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase I, uma sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase II, uma sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase III, ou uma ribozima. Em uma forma de realização, o vetor compreendendo a sequência de ácido nucleico desejada compreende um cDNA de interesse. O cDNA de interesse, seja em um vetor para vRNA ou produção de proteína, pode codificar um epítipo imunogênico, como um epítipo utilizável em uma terapia ou vacina para câncer, ou um peptídeo ou polipeptídeo utilizável em terapia de genes. Quando se prepara o vírus, o vetor ou plasmídeo compreendendo o gene ou cDNA de interesse pode substituir por um vetor ou plasmídeo para um gene viral de influenza ou pode ser além de vetores ou plasmídeos para todos os genes de vírus de influenza.

[00017] Uma pluralidade de vetores da invenção pode ser fisicamente ligada ou cada vetor pode estar presente em um plasmídeo individual ou outros, por exemplo, veículo de liberação de ácido nucleico, linear.

[00018] O promotor ou sequência de terminação de transcrição em um vRNA ou vetor de expressão de proteína viral pode ser igual ou diferente com relação ao promotor ou qualquer outro vetor. Preferivelmente, o vetor ou plasmídeo que expressa vRNA de influenza compreende um promotor apropriado para expressão em pelo menos uma célula hospedeira particular, por exemplo células hospedeiras de aves ou mamíferos, como células de caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, ou primatas, incluindo células de humanos, ou preferivelmente para expressão em mais de um hospedeiro.

[00019] Em uma forma de realização, um ou mais vetores para a produção de vRNA compreendem um promotor incluindo, mas não são limitados a promotor de RNA polimerase I, por exemplo um promotor de

RNA polimerase I, um promotor de RNA polimerase II, um promotor de RNA polimerase III, um promotor T7, ou um promotor T3. As sequências de terminação de transcrição preferidas para os vetores vRNA incluem, mas não são limitadas a sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase I, sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase II, sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase III ou uma ribozima. As ribozimas dentro do escopo da invenção incluem, mas não são limitadas a ribozimas de tetrahimena, RNase P, ribozimas de cabeça de martelo, ribozimas hairpin, ribozima de hepatite, assim como ribozimas sintéticas.

[00020] Em uma forma de realização, pelo menos um vetor para vRNA compreende um promotor de RNA polimerase II ligado a uma sequência de ribozimas ligada a sequências de codificação viral ligadas a outras sequências de ribozimas, opcionalmente ligadas a uma sequência de terminação de transcrição de RNA polimerase II. Em uma forma de realização, pelo menos 2 e preferivelmente mais, por exemplo 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, vetores para a produção de vRNA compreendem um promotor de RNA polimerase II, uma primeira sequência de ribozimas, que é 5' para uma sequência correspondendo a sequências virais incluindo sequências de codificação viral, que é 5' para uma segunda sequência de ribozimas, que é 5' para uma sequência de terminação de transcrição. Cada promotor de RNA polimerase II em cada vetor de vRNA pode ser igual ou diferente que o promotor de RNA polimerase II em qualquer outro vetor vRNA. Similarmente, cada sequência de ribozimas em cada vetor de vRNA pode ser igual ou diferente que as sequências de ribozimas em qualquer outro vetor de vRNA. Em uma forma de realização, as sequências de ribozimas em um único vetor não são iguais.

[00021] A invenção também provê um método para preparar vírus de influenza. O método compreende contatar uma célula com uma pluralidade de vetores da invenção, por exemplo de modo sequencial ou simultâneo, por exemplo empregando uma composição da invenção em uma quantidade

eficaz para dar vírus de influenza infeccioso. A invenção também inclui isolar o vírus de uma célula contactada com a composição. Assim, a invenção ainda provê vírus isolado, assim como uma célula hospedeira contactada com a composição ou vírus da invenção. Em outra forma de realização, a invenção inclui contactar a célula com um ou mais vetores, ou vetores de produção de proteína ou vRNA, antes de outros vetores, ou vetores vRNA ou de produção de proteína.

[00022] O método da invenção permite uma fácil manipulação de vírus de influenza, por exemplo pela introdução de atenuação de mutações no genoma viral. Além disso, porque os vírus de influenza induzem uma imunidade celular e humoral forte, a invenção aumenta muito estes vírus como vetores de vacina, particularmente em vista da disponibilidade de variantes naturais do vírus, que podem ser empregados sequencialmente permitindo o uso repetitivo para terapia de genes.

[00023] Os métodos de produção de vírus aqui descritos, que não requerem infecção de vírus auxiliar, são utilizáveis em estudos de mutagênese viral, e na produção de vacinas (por exemplo para AIDS, influenza, hepatite B, hepatite C, rinovírus, filovírus, malária, herpes, e febre aftosa), e vetores de terapia de genes (por exemplo para câncer, AIDS, adenosina desaminase, distrofia muscular, deficiência de ornitina transcarbamilase, e tumores do sistema nervoso central. Assim, um vírus para uso em terapia médica (por exemplo para uma vacina ou terapia de genes) é provido.

[00024] A invenção também provê um método para imunizar um indivíduo contra um patógeno, por exemplo uma bactéria, vírus, um parasita, ou um tumor maligno. O método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade de pelo menos um vírus isolado da invenção, opcionalmente em combinação com um adjuvante, eficaz para imunizar o indivíduo. O vírus compreende vRNA compreendendo um polipeptídeo codificado pelo patógeno ou um polipeptídeo específico para tumor.

[00025] Também é provido um método para aumentar ou elevar a expressão de uma proteína endógena em um mamífero tendo uma indicação ou doença caracterizada por uma quantidade diminuída ou uma falta de uma proteína endógena. O método compreende a administração ao mamífero de uma quantidade de um vírus isolado da invenção eficaz para aumentar ou elevar a quantidade de proteína endógena no mamífero. Preferivelmente, o mamífero é um humano.

Breve Descrição dos Desenhos

[00026] Figura 1. Diagrama esquemático de sistemas genéticos reversos estabelecidos. No processo de transfecção de RNP (A), proteínas NP e polimerase purificadas são montadas em RNPs com o uso de vRNA sintetizado in vitro. As células são transfectadas em RNPs, seguido por infecção com vírus auxiliar. No método de RNA polimerase I (B), um plasmídeo contendo o promotor de RNA polimerase I, um cDNA codificando o vRNA a ser resgatado, e o terminador de RNA polimerase I é transfectado nas células. A transcrição intracelular por RNA polimerase I dá vRNA sintético, que é embalado em partículas de vírus de progênie quando da infecção com o vírus auxiliar. Com ambos os métodos, vírus transfectantes (isto é, os contendo RNA derivado de cDNAs clonados), são selecionados da população de vírus auxiliar.

[00027] Figura 2. Diagrama esquemático de geração de construções de RNA polimerase I. cDNAs derivados de vírus de influenza foram amplificados por PCR, digeridos com *BsmBI* e clonados nos sítios de *BsmBI* do vetor pHH21. (E. Hoffmann, tese de Ph. D., Jutus, Liebig- University, Giessen, Alemanha), que contém o promotor de RNA polimerase I humano e o terminador de RNA polimerase I de camundongo (T). O nucleotídeo timidina a montante da sequência de terminador (*T) representa a extremidade 3' do RNA viral de influenza. As sequências de vírus de influenza A são mostradas em letras de face negrito (SEQ ID NO: 29-40).

[00028] Figura 3. O método de genética reversa proposto para gerar vírus RNA de sentido negativo segmentado. Os plasmídeos contendo o promotor de RNA polimerase I um cDNA de cada um dos oito segmentos de RNA viral, e o terminador de RNA polimerase I são transfectados em células junto com plasmídeos de expressão de proteína. Apesar de vírus infecciosos poderem ser gerados com plasmídeos expressando PA, PB1, PB2 e NP, a expressão de todas as proteínas estruturais restantes (mostradas em parêntese) aumenta a eficácia de produção de vírus dependendo do vírus gerado.

[00029] Figura 4. Título de vários vírus de influenza.

Descrição detalhada da invenção

Definições

[00030] Com usado aqui, os termos “isolado e/ou purificado” se referem a preparação isolamento e/ou purificação in vitro de um vetor, plasmídeo ou vírus da invenção, de modo que ele não está associado com substâncias in vivo, ou é substancialmente purificado a partir de substâncias in vitro. Uma preparação de vírus isolada é geralmente obtida pela cultura in vitro e propagação e é substancialmente isento de outros agentes infecciosos.

[00031] Como usado, “substancialmente isento” significa abaixo do nível de detecção para um agente infeccioso particular usando métodos de detecção padrões para este agente.

[00032] Um vírus “recombinante” é um que foi manipulado in vitro, por exemplo usando técnica de DNA recombinante, para introduzir mudanças no genoma viral.

[00033] Como usado, o termo “ácido nucleico recombinante” ou “sequência de DNA recombinante ou segmento” se refere a um ácido nucleico, por exemplo a DNA, que foi derivado ou isolado de uma fonte, que pode ser subsequentemente quimicamente alterado in vitro, de modo que sua sequência não é de ocorrência natural, ou corresponde a sequências de ocorrência natural que não estão posicionadas como elas derivam estar

posicionadas no genoma nativo. Um exemplo de DNA ‘derivado’ de uma fonte, deve ser uma sequência de DNA que é identificada como um fragmento utilizável, e que é então quimicamente sintetizado em uma forma essencialmente pura. Um exemplos deste DNA “isolado” de uma fonte seria uma sequência de DNA utilizável que é excisada ou removida da referida fonte por meios químicos, por exemplo pelo uso de endonucleases de restrição, de modo que pode ser ainda manipulado, por exemplo amplificado, para uso na invenção, pela metodologia de engenharia genética.

Replicação de vírus de influenza

[00034] O vírus de influenza A possui um genoma de oito RNAs virais de sentido negativo, filamento único, (vRNAs) que codificam um total de dez proteínas. O ciclo de vida do vírus de influenza começa com a ligação de receptores contendo hemaglutinina (HA) para ácido siálico sobre a superfície da célula hospedeira, seguido por endocitose mediada por receptor. O pH baixo em endossomas tardios aciona uma mudança conformacional em HA, assim expondo o N-término da subunidade HA2 (o assim chamado peptídeo de fusão). O peptídeo de fusão inicia a fusão da membrana viral e endossomal, e os complexos de proteína de matriz (M1) e RNP são liberados no citoplasma. RNPs consistem de nucleoproteína (NP), que encapsida vRNA, e o complexo de polimerase viral, que é formado pelas proteínas PA, PB1 e PB2. RNPs são transportados para o núcleo, onde a transcrição e a replicação ocorrem. O complexo de RNA polimerase catalisa três diferentes reações: síntese de um mRNA com uma capa 5' e estrutura poly A 3', de um RNA complementar de comprimento completo, (cRNA), e de vRNA genômico, usando o cDNA como gabarito. vRNAs recentemente sintetizados, NP e proteínas polimerase, são então montados nos RNPs, exportados do núcleo, e transportados para a membrana de plasma, onde a formação de brotos de partículas de vírus de progênie ocorre. A proteína neuraminidase (NA) desempenha um papel crucial tardio em infecção por remoção de ácido

siálico de sialiloligossacarídeos, assim liberando virions recentemente montados da superfície da célula e evitando a auto-agregação das partículas virais. Apesar da montagem de vírus envolver interações proteína -proteína e proteína – vRNA, a natureza destas interações é muito desconhecida.

[00035] Apesar dos vírus de influenza B e C serem similares de modo estrutural e funcional, para o vírus de influenza A, existem algumas diferenças. Por exemplo, o vírus de influenza B não tem uma proteína M2 com atividade de canal de íons. similarmente, o vírus de influenza C não tem uma proteína M2 com atividade de canal de íons. NO entanto, a proteína CM1 provavelmente tem esta atividade. A atividade de uma proteína de canal de íons pode ser medida por métodos bem conhecidos dos versados na arte, ver, por exemplo, Holsinger et al. (1994) e WO 01/79273.

Linhagens de células e vírus de influenza que podem ser usados na presente invenção

[00036] De acordo com a presente invenção, qualquer célula que suporte uma replicação eficaz de vírus de influenza pode ser empregada na invenção, incluindo células mutantes que expressam níveis reduzidos ou diminuídos de um ou mais ácidos siálicos que são receptores para o vírus de influenza. Os vírus obtidos pelos métodos podem ser feitos em um vírus reagrupante.

[00037] Preferivelmente, as células são linhagens de células contínuas certificadas pela WHO, ou certificáveis. As exigências para certificar estas linhagens de células incluem caracterização com relação a pelo menos um dentre genealogia, características de crescimento, marcadores imunológicos, tumorigenicidade, susceptibilidade de vírus, e condições de armazenamento, assim como por testes em animais, ovos e cultura de células. Esta caracterização é usada para confirmar que as células são livres de agentes adventícios detectáveis. Em alguns países, a cariologia também pode ser requerida. Além disso, a tumorigenicidade é preferivelmente testada em

células que estão no mesmo nível de passagem que as usadas para produção de vacinas. O vírus é preferivelmente purificado por um método que foi mostrado como dando resultados consistentes, antes de ser inativado ou atenuado para produção de vacina (ver, por exemplo, World Health Organization, 1982).

[00038] Prefere-se estabelecer uma caracterização completa das linhagens de células a serem usadas, de modo que testes apropriados para pureza do produto final podem ser incluídos. Os dados que podem ser usados para a caracterização de uma célula a ser usada na presente invenção incluem (a) informação de sua origem, derivação, e história de passagem, (b) informação sobre seu crescimento e características morfológicas, (c) resultados de testes de agentes adventícios, (d) aspectos distintos, como padrões bioquímicos, imunológicos, e citogenéticos, que permitem que as células sejam claramente reconhecidas dentre outras linhagens de células, e (e) resultados de testes para tumorigenicidade. Preferivelmente, o nível de passagem ou duplicação de população, da célula hospedeira deve ser tão baixo como possível.

[00039] Prefere-se que o vírus produzido na célula seja altamente purificado antes da formulação da terapia de gene ou vacina. Geralmente, os procedimentos de purificação irão resultar em remoção extensiva de DNA celular, outros componentes celulares, e agentes adventícios. Os procedimentos que extensivamente degradam ou desnaturam o DNA podem ser também usados. Ver, por exemplo, Mizrahi, 1990.

Vacinas

[00040] Uma vacina da invenção pode compreender proteínas imunogênicas incluindo glicoproteínas de qualquer patógeno, por exemplo uma proteína imunogênica de um ou mais dentre bactérias, vírus, leveduras ou fungos. Assim, em uma forma de realização, o vírus de influenza da invenção pode ser de vetores de vacina para vírus de influenza ou outros

patógenos virais incluindo, mas não são limitados a lentivírus, como HIV, vírus de hepatite B, vírus de hepatite C, vírus de herpes, como CMV ou HSV, ou vírus de febre aftosa.

[00041] Uma vacina de vírion completa é concentrada por ultrafiltração e então purificada por centrifugação zonal ou por cromatografia. Ele é inativado antes ou após purificação usando formalina ou beta-propiolactona, por exemplo.

[00042] Uma vacina de subunidade compreende glicoproteínas purificadas. Esta vacina pode ser assim preparada: usar suspensão viral fragmentada por tratamento com detergente, os antígenos de superfície são purificados, por ultra-centrifugação por exemplo. As vacinas de subunidade assim contém principalmente proteína HA, e também NA. O detergente usado pode ser catiônico, por exemplo, como brometo de hexadecil trimetil amônio (Bachmeyer, 1975), um detergente aniônico como deoxicolato de amônio (Laver & Webster, 1976); ou um detergente não iônico como que comercializado sob o nome TRITON X100. A hemaglutinina pode ser também isolada após tratamento dos virions com uma protease como bromelina, então purificada por um método como descrito por Grand e Skehel (1972).

[00043] Uma vacina dividida compreende virions que foram submetidos a tratamento com agentes que dissolvem lipídeos. Uma vacina dividida pode ser preparada como: uma suspensão aquosa de vírus purificado obtido como acima, inativado ou não, é tratado sob agitação, por solventes de lipídeos como éter etílico ou clorofórmio, associados com detergentes. A dissolução dos lipídeos de envelope viral resulta em fragmentação das partículas virais. A fase aquosa é recuperada contendo a vacina dividida, constituída principalmente por hemaglutinina e neuraminidase com outro meio de lipídeo original removido, e o núcleo ou seus produtos de degradação. Então, as partículas infecciosas residuais são inativadas se isto já

não foi feito.

[00044] Vacinas inativadas – As vacinas inativadas de vírus de influenza da invenção são providas por inativação do vírus replicado da invenção usando métodos conhecidos como, mas não são limitados a tratamento com formalina ou β -propiolactona. Os tipos de vacinas inativadas que podem ser usados na invenção pode incluir vacinas de vírus completo (WV) ou vacinas de sub-virions (SV) (divididas). A vacina WV contém vírus inativados, intactos, enquanto a vacina SV contém vírus purificados rompidos com detergentes que solubilizam o envelope viral contendo lipídeo, seguido por inativação química de vírus residual.

[00045] Além disso, as vacinas que podem ser usadas incluem as contendo as proteínas de superfície NA e HA isoladas, que são referidas como vacinas de subunidade ou antígeno de superfície. Em geral, as respostas a vacina de antígeno de superfície e SV (isto é, HA ou NA purificado), são similares. Uma vacina WV inativada experimental contendo um antígeno NA imunologicamente relacionado para o vírus epidêmico e um HA não relacionado parecem ser menos eficazes do que as vacinas convencionais (Ogra et al., 1977). As vacinas inativadas contendo ambos os antígenos de superfície relevantes são preferidas.

[00046] Vacinas de vírus atenuado vivo. Vacinas de vírus de influenza atenuado vivo, também podem ser usadas para evitar ou tratar infecção por vírus de influenza, de acordo com as etapas de métodos conhecidos. A atenuação é preferivelmente obtida em uma etapa única por transferência de genes atenuados de um vírus doador atenuado a um isolado replicado ou um vírus reagrupante de acordo com os métodos conhecidos (ver, por exemplo, Murphy, 1993). Porque a resistência a vírus de influenza A é mediada pelo desenvolvimento de resposta imune às glicoproteínas HA e Na, os genes codificando par estes antígenos de superfície devem vir de vírus reagrupantes ou isolados clínicos de elevado crescimento. Os genes atenuados são

derivados de parental atenuado. Nesta abordagem, os genes que conferem atenuação preferivelmente não codificam para as glico-proteínas HA e NA. De outra forma, estes genes não podem ser transferidos para reagrupantes contendo os antígenos de superfície do isolado de vírus clínico.

[00047] Muitos vírus doadores foram avaliados por sua capacidade de atenuar de modo reprodutível os vírus de influenza. Como um exemplo não limitativo, o vírus doador adaptado (ca) de resfriado A/Ann Arbor (AA) 6/60 (H2N2) pode ser usado para produção de vacina atenuada (ver, por exemplo, Edwards, 1994; Murphy, 1993). Adicionalmente, vacinas de vírus reagrupantes atenuadas, vivas, podem ser geradas por casamento do vírus doador de ca com um vírus replicado virulento da invenção. A progênie reagrupante é então selecionada a 25 °C, (limitativa a replicação de vírus virulento), na presença de um antisoro H2N2, que inibe a replicação dos vírus contendo os antígenos de superfície do vírus doador de ca A/AA/ 6/60 (H2N2).

[00048] Uma grande série de reagrupantes H1N1 e H3N2 foi avaliada em humanos e verificou-se ser satisfatória: (a) infecciosa, (b) atenuada para crianças soro-negativas e adultos iniciados imunologicamente, (c) imunogênica e (d) geneticamente estável. A imunogenicidade dos reagrupantes de ca está em paralelo com seu nível de replicação. Assim, a aquisição dos seis genes transferíveis do vírus doador de ca por vírus de tipo selvagem novos atenuou de modo reprodutível estes vírus para uso na vacinação de adultos susceptíveis e crianças.

[00049] Outras mutações atenuantes podem ser introduzidas em genes de vírus de influenza por mutagenese dirigida ao sítio para resgatar vírus infecciosos contendo estes genes mutantes. As mutações atenuantes podem ser introduzidas em regiões de não codificação do genoma, assim com em regiões de codificação. Estas mutações atenuantes também podem ser introduzidas em genes diferentes de HA ou NA, por exemplo, o gene de

polimerase PB2 (Subbarao et al., 1993). Assim, novos vírus doadores podem ser também gerados contendo mutações atenuantes introduzidas por mutagenese dirigida ao sítio, e estes novos vírus doadores podem ser usados na redução de reagrupantes atenuados vivos candidatos a vacina H1N1 e H3N2 em um modo análogo ao descrito acima para o vírus doador de ca A/AA/6/60. Similarmente, outras cepas doadoras atenuadas apropriadas e conhecidas podem ser reagrupadas com vírus de influenza da invenção para obter vacinas atenuadas apropriadas para uso na vacinação de mamíferos (Enami et al., 1990; Muster et al., 1991; Subbarao et al., 1993).

[00050] Prefere-se que estes vírus atenuados mantenham os genes do vírus que codificam determinantes antigênicos substancialmente similares aos dos isolados clínicos originais. Isto é porque o fim da vacina atenuada é prover substancialmente a mesma antigenicidade como o isolado clínico original do vírus enquanto, ao mesmo tempo, faltando infectividade ao grau que a vacina causa uma mudança mínima de indução de uma condição patogênica séria no mamífero vacinado.

[00051] O vírus pode assim ser atenuado ou inativado, formulado e administrado, de acordo com métodos conhecidos, como uma vacina para induzir uma resposta imune em um animal, por exemplo um mamífero. Os métodos são bem conhecidos dos versados na arte para a determinação de ser estas vacinas atenuadas ou inativadas mantiveram uma antigenicidade similar à do isolado clínico ou cepa de crescimento elevado derivada daí. Estes métodos conhecidos incluem o uso de anti-soros ou anticorpos para eliminar vírus expressando determinantes antigênicos do vírus doador, seleção química (por exemplo amantadina ou rimantidina), atividade de HA e NA, e inibição; e triagem de DNA (como hibridização de sonda ou PCR), para confirmar que os genes doadores codificando os determinantes antigênicos (por exemplo genes HA ou NA) não estão presentes nos vírus atenuados. Ver, por exemplo, Robertson et al., 1988; Kilbourne, 1969; Aymard-Henry et al., 1985;

Robertson et al., 1992.

Composições farmacêuticas

[00052] As composições farmacêuticas da presente invenção, apropriadas para inoculação ou para administração oral ou parenteral, compreendem vírus de influenza atenuados ou inativados, opcionalmente ainda compreendendo soluções aquosas ou não aquosas estéreis, suspensão, e emulsões. As composições podem ainda compreender agentes auxiliares ou excipientes, como bem conhecido na arte. Ver, por exemplo, Berkow et al., 1987; Avery's Drug Treatment, 1987; Osol, 1980; Katzung, 1992. A composição da invenção é geralmente apresentada na forma de doses individuais (doses únicas).

[00053] As vacinas convencionais geralmente contêm cerca de 0,1 a 200 µg, preferivelmente 10 a 15 µg, de hemaglutinina de cada uma das cepas que entram em sua composição. A vacina formando o componente principal da composição de vacina da invenção pode compreender um vírus de tipo A, B ou C, ou qualquer combinação dos mesmos, por exemplo, pelo menos dois dos três tipos, pelo menos dois de diferentes subtipos, pelo menos dois do mesmo tipo, pelo menos dois do mesmo sub-tipo, ou isolado(s) ou reagrupante(s) diferentes. O vírus de influenza humano tipo A inclui H1N1, H2N2 e H3N2.

[00054] As preparações para administração parenteral incluem soluções aquosas ou não aquosas estéreis, suspensões e/ou emulsões, que podem conter agentes auxiliares ou excipientes bem conhecidos na arte. Os exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. Os veículos ou curativos oclusivos podem ser usados para aumentar a permeabilidade da pele e melhorar a absorção de antígeno. As formas de dosagem líquidas para administração oral podem geralmente compreender uma solução de lipossoma contendo a forma de dosagem

líquida. As formas apropriadas para suspensão de lipossomas incluem emulsões, suspensões, soluções, xaropes, e elixires contendo diluentes inertes comumente usados na arte, como água purificada. Além dos diluentes inertes, estas composições também podem incluir adjuvantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes de suspensão, ou adoçantes, aromatizantes ou agentes perfumantes. Ver, por exemplo, Berkow et al., 1992; Avery's, 1987; Osol, 1980; e Katzung, 1992.

[00055] Quando uma composição da presente invenção é usada para administração a um indivíduo, ela pode ainda compreender sais, tampões, adjuvantes, ou outras substâncias que são desejáveis para melhorar a eficácia da composição. Para vacinas, adjuvantes, substâncias que podem aumentar uma resposta imune específica, podem ser usados. Normalmente, o adjuvante e a composição são misturados antes da apresentação ao sistema imune, ou apresentados em separado, mas no mesmo sítio do organismo sendo imunizado. Os exemplos de materiais apropriados para uso em composições de vacina são providos em Osol (1980).

[00056] Heterogeneidade em uma vacina pode ser provida por misturação de vírus de influenza replicados para pelo menos duas cepas de vírus de influenza, como 2-50 cepas ou qualquer faixa ou valor na mesma. As cepas de vírus de influenza A ou B tendo uma composição antigênica moderna são preferidas. De acordo com a presente invenção, vacinas podem ser providas para variações em uma única cepa de um vírus de influenza, usando técnicas bem conhecidas na arte.

[00057] Uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode ainda ou adicionalmente compreender pelo menos um composto quimio-terapêutico, por exemplo para terapia de genes, imunossuppressores, agentes anti-inflamatórios, ou melhoradores imunes, e para vacinas, quimio-terapêuticos incluindo, mas não limitados a gama globulina, amantadina, guanidina, hidroxibenzimidazol, interferon- α ,

interferon- β , interferon- γ , fator alfa de necrose de tumor, tiossmicarbarzonas, metisazona, rifampina, ribavirina, um análogo de pirimidina, um análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, dideoxynucleosídeos, um inibidor de protease, ou ganciclovir. Ver, por exemplo, Katzung (1992), as referências citadas nas páginas 798 - 800 e 680 - 681, respectivamente.

[00058] A composição também pode conter quantidades variáveis porém pequenas de formaldeído isento de endotoxina, e conservantes, que foram verificados como seguros e não contribuindo para efeitos indesejáveis no organismo ao qual a composição é administrada.

Fins farmacêuticos

[00059] A administração da composição (ou o antisoro que ela elicit) pode ser ou para um fim “profilático” ou “terapêutico”. Quando provida de modo profilático, as composições da invenção que são vacinas são administradas antes de qualquer sintoma de uma infecção por patógeno se manifestar. A administração profilática a composição serve para evitar ou atenuar qualquer infecção subsequente. Quando dada de modo profilático, as composições de terapia de gene da invenção, são dadas antes que qualquer sintoma de uma doença se torne manifestado. A administração profilática da composição serve para evitar ou atenuar um ou mais sintomas associados com a doença.

[00060] Quando administrada de modo terapêutico, uma vacina viral atenuada ou inativada é dada quando da detecção de um sintoma de infecção real. A administração terapêutica do composto(s) serve para atenuar qualquer infecção real. Ver, por exemplo, Berkow et al., 1992; Avery, 1987; e Katzung, 1992. Quando terapeuticamente administrada, uma composição de terapia de genes é administrada quando da detecção de um sintoma ou indicação da doença. A administração terapêutica do (s) composto(s) serve para atenuar um sintoma ou indicação desta doença.

[00061] Assim, uma composição de vacina atenuada ou inativada da

presente invenção pode ser assim provida ou antes do início de infecção (de modo a evitar ou atenuar uma infecção antecipada), ou após o início de uma infecção real. Similarmente, para terapia de genes, a composição pode ser provida antes de qualquer sintoma de um distúrbio ou doença ser manifestado ou após um ou mais sintomas serem detectados.

[00062] Afirma-se que uma composição é “farmacologicamente aceitável” se sua administração pode ser tolerada por um paciente recipiente. Afirma-se que este agente é administrado em uma “quantidade terapeuticamente eficaz” se a quantidade administrada for fisiologicamente significativa. Uma composição da presente invenção é fisiologicamente significativa se sua presença resultar em uma mudança detectável na fisiologia de um paciente recipiente, por exemplo melhora de pelo menos uma resposta imune celular ou humoral secundária ou primária contra, pelo menos, uma cepa de um vírus de influenza infeccioso.

[00063] A “proteção” provida não precisa ser absoluta, isto é, a infecção por influenza não precisa ser totalmente evitada ou erradicada, se se obtiver uma melhora significativa estatisticamente comparada com uma população de controle ou conjunto de pacientes. A proteção pode ser limitada a mitigar a severidade ou rapidez do início dos sintomas da infecção por vírus de influenza.

Administração farmacêutica

[00064] Uma composição da presente invenção pode conferir resistência a um ou mais patógenos, por exemplo uma ou mais cepas de vírus de influenza, ou por imunização passiva ou imunização ativa. Em imunização ativa, uma composição de vacina viva atenuada ou inativada é administrada de modo profilático a um hospedeiro (por exemplo um mamífero) e a resposta imune do hospedeiro à administração protege contra infecção e/ou doença. Para imunização passiva, o anti-soro elicitado pode ser recuperado e administrado para um recipiente que se suspeita tenha uma infecção causada

por, pelo menos, uma cepa de vírus de influenza. Uma composição de terapia de genes da presente invenção pode dar níveis profiláticos ou terapêuticos do produto de gene desejado por imunização ativa.

[00065] Em uma forma de realização, a vacina é administrada a um mamífero do sexo feminino (em ou antes da gravidez ou parto), sob condições de tempo e quantidade suficiente para causar a produção de uma resposta imune que serve para proteger a pessoa e o feto ou o recém-nascido (via incorporação passiva dos anticorpos através da placenta ou no leite da mãe).

[00066] A presente invenção assim inclui métodos para evitar ou atenuar uma doença ou distúrbio, por exemplo uma infecção por, pelo menos, uma cepa de patógeno. Como usado aqui, afirma-se que uma vacina evita ou atenua uma doença se sua administração resultar ou na atenuação total ou parcial (isto é, supressão) de um sintoma ou condição da doença, ou na imunidade total ou parcial do indivíduo à doença. Como usado aqui, uma composição de terapia de genes é dita como evitando ou atenuando uma doença se esta administração resultar ou na atenuação total ou parcial (isto é, supressão) de um sintoma ou condição da doença, ou na imunidade total ou parcial do indivíduo à doença.

[00067] Pelo menos um vírus de influenza atenuado ou inativado, ou composição do mesmo, da presente invenção pode ser administrado por qualquer meio que obtém os fins pretendidos, usando uma composição farmacêutica como previamente descrito.

[00068] Por exemplo, a administração desta composição pode ser por várias vias parenterais como vias subcutânea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, oral ou transdérmica. A administração parenteral pode ser por injeção de bolo ou por perfusão gradual com o tempo. Um modo preferido de usar uma composição farmacêutica da presente invenção é por aplicação intramuscular ou subcutânea, Ver, por exemplo, Berkow et al., 1992; Avery, 1987; e Katzung, 1992.

[00069] Um regime típico para evitar, suprimir ou tratar uma patologia relacionada com vírus de influenza, compreende a administração de uma quantidade eficaz de uma composição de vacina como aqui descrito, administrada como um tratamento único, ou repetida como dosagens de reforço ou de melhora, durante um período de até e incluindo entre uma semana e cerca de 24 meses, ou qualquer faixa ou valor entre os mesmos.

[00070] De acordo com presente invenção, uma “quantidade eficaz” de uma composição é uma que é suficiente para obter um efeito biológico desejado. Entende-se que a dosagem eficaz será dependente da idade, sexo, saúde, e peso do recipiente, tipo de tratamento concorrente, se presente, frequência do tratamento e a natureza do efeito desejado. As faixas de doses eficazes dadas abaixo não se destinam a limitar a invenção e representam faixas de doses preferidas. No entanto, a dosagem mais preferida será adequada ao indivíduo individual, como é entendido e determinável por um versado na arte. Ver, por exemplo, Berkow et al., 1992; Avery's, 1987; e Katsung, 1992.

[00071] A dosagem de vacina de vírus atenuado para um organismo adulto de mamífero (por exemplo humano) ou ave pode ser de cerca de 10^3 – 10^7 unidades formadoras de placas (PFU)/ kg, ou qualquer faixa ou valor ai. A dose de vacina inativada pode estar na faixa de cerca de 0,1 a 200, por exemplo 50 µg de proteína de hemaglutinina. NO entanto, a dosagem deve ser uma quantidade segura e eficaz como determinado por métodos convencionais, usando vacinas existentes como um ponto de partida.

[00072] A dosagem de HA imuno-reativo em cada dose de vacina de vírus replicado pode ser padronizada para conter uma quantidade apropriada, por exemplo 1-50 µg ou qualquer faixa ou valor ai, ou a quantidade recomendada pelo US Public Health Service (PHS), que é geralmente de 15 µg, por componente para crianças acima de 3 anos de idade, e 7,5 µg por componente para crianças mais velhas < 3 anos de idade. A quantidade de NA

também pode ser padronizada, no entanto, esta glico-proteína pode ser lábil durante a purificação e armazenamento do processador (Kendal et al., 1980). Cada dose de 0,5 ml de vacina preferivelmente contém aproximadamente 1-50 bilhões de partículas de vírus, e preferivelmente 10 bilhões de partículas.

[00073] A invenção será ainda descrita pelos seguintes exemplos.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

[00074] Células e vírus. Células de rim embriônico humano 293T e células de rim canino Madin-Darby (MDCK) foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro de bezerro fetal a 10% e em meio de Eagle modificado (MEM) contendo 5% de soro de bezerro recém-nascido, respectivamente. Todas células foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Vírus de influenza A/WSN/33 (H1N1) e A/PR/8/34 (H1N1) foram propagadas em ovos de 10 dias.

[00075] Construção de plasmídeos. Para gerar construções de RNA polimerase I cDNAs clonados derivados de A/WSN/33 ou A/PR/8/34 RNA viral foram introduzidos entre as sequências de promotor e terminador de RNA polimerase I. Brevemente, os cDNAs clonados foram amplificados por PCR com iniciadores contendo sítios *BsmBI*, digeridos com *BsmBI*, e clonados no sítio *BsmBI* do vetor pHH21 que contém o promotor de RNA polimerase I humano e o terminador de RNA polimerase I de camundongo, separados por sítios *BsmBI* (figura 2). Os genes PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, e NS da cepa A/WSN/33 foram amplificados por PCR pelo uso dos seguintes plasmídeos: pSCWPB2, pGW-PB1, e pSCWPA (todos obtidos de Dr. Debi Nayak at the University of California Los Angeles), e pWH17, pWNP152, pT3WNA15 (Castrucci et al., 1992), pGT3WM, e pWNS1, respectivamente. O gene PB1 de vírus de influenza A/PR/8/34 foi amplificado por usar pcDNA774 (PB1) (Perez et al., 1998) como um gabarito. Ver Figura 6 para sequências de iniciadores. Para assegurar que os genes eram isentos de

mutações indesejadas, os fragmentos derivados de PCR foram sequências com um auto-sequenciador (Applied Biosystem Inc., CA, USA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Os cDNAs codificando os genes HA, NP, NA, e M1 de vírus A/WSN/33 foram clonados como descrito (Huddleston et al., 1982) e subclonados no vetor de expressão eucariótico pCAGGS/MCS (controlado pelo promotor β -actina de galinha) (Niwa et al., 1991), resultando em pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0-14, pCAGGS-WNA15, e pCAGGS-WSN-M1-2/1, respectivamente. Os genes M2 e NS2 de vírus A/PR/8/34 foram amplificados por PCR e clonados em pCAGGS/MCS, dando pEP24c e pCA-NS2. Finalmente, pcDNA774(PB1), pcDNA762(PB2), e pcDNA787(PA) foram usados para expressar as proteínas PB2, PB1, e PA sob controle do promotor de citomegalovírus (Perez et al., 1998).

[00076] Geração de partículas de influenza infecciosas. Células 293T (1×10^6) foram transferidas com um máximo de 17 plasmídeos em quantidades diferentes com uso de Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) de acordo com as instruções dos fabricantes. Brevemente, DNA e reagente de transfecção foram misturados (2 μ l Trans IT-LT-1 por μ g de DNA), incubados em temperatura ambiente durante 45 minutos e adicionados nas células. Seis horas depois, a mistura de reagente de transfecção de DNA foi substituída por Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) contendo 0,3% de albumina de soro bovino e 0,01% de soro de bezerro fetal. Em diferentes tempos após a transfecção, os vírus foram coletados do sobrenadante e titulados em células MDCK. Porque o vírus auxiliar não foi requerido por este procedimento, os vírus transfectantes recuperados foram analisados sem purificação de placa.

[00077] Determinação da percentagem de vírus produzindo células transfectadas com plasmídeo. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células 293T foram dispersadas com 0,02% de EDTA em células únicas. A suspensão de célula foi então diluída 10 vezes e transferida para

monocamadas confluentes de células MDCK em placas de 24 cavidades. Os vírus foram detectados pelo teste de hemaglutinação.

[00078] Teste de imuno-coloração. Nove horas após a infecção com o vírus de influenza, células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixadas com 3,7% de paraformaldeído (em PBS) durante 20 minutos em temperatura ambiente. A seguir, elas foram tratadas com 0,1% de Triton X-100 e processadas como descrito por Neumann et al. (1997).

Resultados

[00079] Geração de vírus infecciosos por expressão acionada por plasmídeo de segmentos de RNA viral, três subunidades de polimerase e proteína NP. Apesar da transfecção de células com uma mistura de RNPs extraída de virions purificados resultar em partículas de influenza infecciosas, esta estratégia não é provavelmente eficaz quando usada com oito diferentes RNPs gerados in vitro. Para produzir vírus de influenza infecciosos completamente a partir de cDNAs, oito RNPs virais foram gerados in vivo. Assim, plasmídeos foram preparados que contém cDNAs para os RNAs virais de comprimento completo do vírus A/WSN/33, flanqueados pelo promotor de RNA polimerase I humano e o terminador de RNA polimerase I de camundongo. Em princípio, a transfecção destes oito plasmídeos em células eucarióticas deve resultar na síntese de todos os outros vRNAs de influenza. As proteínas PB2, PB1, PA e NP, geradas por co-transfecção de plasmídeos de expressão de proteína, devem então se reunir ao vRNAs em vRNPs funcionais que são replicados e transcritos, por fim formando vírus de influenza infecciosos (figura 3). 1 x 10⁶ 293T células foram transfectadas com plasmídeos de expressão de proteína (1 µg de pcDNA762(PB2), 1 µg de pcDNA774 (PB1), 0,1 µg de pcDNA787 (PA), e 1 µg de pCAGGS-WSN-NP0/14) e 1 µg de cada dos seguintes plasmídeos de RNA polimerase I (pPo1I-WSN-PB2, pPo1I-WSN-PB1, pPo1I-WSN-PA, pPo1I-WSN-HA,

pPo1I-WSN-NP, pPo1I-WSN-NA, pPo1I-WSN-M, e pPo1I-WSN-NS). A decisão para usar uma quantidade reduzida de pcDNA787(PA) foi baseada nas observações prévias (Mena et al., 1996), e dados nas condições ótimas para a geração de partículas semelhantes a vírus (VLPs) (dados não mostrados). 24 h após a transfecção de células 293T, 7 x 10³ pfu de vírus por ml foram verificados no sobrenadante (experiência 1, tabela 1), demonstrado, pela primeira vez, a capacidade de genética reversa de produzir vírus de influenza A completamente a partir de plasmídeos.

Tabela 1. Conjuntos de plasmídeos usados para produzir vírus de influenza de cDNA* clonado

plasmídeos de RNA polimerase I para:†		Experiência							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	PB1	+	+	-	-	-	-	-	-
	PR8-PB1	-	-	+	+	+	+	+	+
	PB2	+	+	+	+	+	+	+	+
	PA	+	+	+	+	+	+	+	+
	HA	+	+	+	+	+	+	+	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	+
	NA	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	+	+	+	+	+	+	+	+
	NS	+	+	+	+	+	+	+	+
plasmídeos de expressão de proteína para:									
	PB1	+	+	+	+	+		+	+
	PB2	+	+	+	+	+	+	-	+
	PA	+	+	+	+	+	+	-	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	-
	HA	-	+	-	+	+	+	+	+
	NA	-	+	-	+	+	+	+	+
	M1	-	+	-	+	+	+	+	+
	M2	-	+	-	+	+	+	+	+
	NS2	-	+	-	+	+	+	+	+
título de vírus (pfu/ ml)		7 x 10 ³	7 x 10 ³	1 x 10 ³	3 x 10 ⁴	0	0	0	0

* células 293T foram transferidas com os plasmídeos indicados. Vinte e quatro (experiências 1 e 2) ou quarenta e oito horas (experiências 3 - 8) depois, o título viral no sobrenadante foi determinado em células MDCK.

† salvo indicado em contrário, plasmídeos foram construídos com cDNAs representando os RNAs de vírus A/WSN/33.

[00080] A eficácia de produção de vírus de influenza com co-expressão de todas as proteínas estruturais virais. Apesar da expressão de proteínas de polimerase e NP viral ser suficiente para a geração acionada por plasmídeos de vírus de influenza, foi possível que a eficácia fosse melhorada. Em estudos anteriores, a expressão de todas as proteínas estruturais de vírus de influenza (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, e NS2) resultou em VLPs que continham um vRNA artificial codificando um gene cloranfenicol-acetiltransferase repórter (Mena et al., 1996). Assim, a disponibilidade de complemento completo de proteínas estruturais, em vez de somente as requeridas para a replicação e transcrição de RNA viral, pode melhorar a eficácia de produção de vírus. Para isto, as células 293T foram transfectadas com quantidades ótimas de plasmídeos de expressão de proteína viral (como julgado por produção de VLP, dados não publicados): 1 µg de pcDNA762(PB2) e pcDNA774(PB1); 0,1 µg de pcDNA787(PA); 1 µg de pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0/14, e pCAGGS-WNA15; 2 µg de pCAGGS-WSN-M1-2/1; 0,3 µg de pCA-NS2; e 0,03 µg de pEP24c (para M2), junto com 1 µg de cada plasmídeo de RNA polimerase I (experiência 2, tabela 1). Um segundo conjunto de células foi transfectado com o mesmo conjunto de plasmídeos de RNA polimerase I, exceto o gene PB1, para o qual pPo1I-PR/8/34/PB1 foi substituído em um esforço para gerar um vírus reagrupante, junto com plasmídeos expressando apenas PA, PB1, PB2, e NP (experiência 3, Tabela 1) ou os expressando todas as proteínas estruturais de influenza (experiência 4, tabela 1). Os rendimentos de vírus WSN não diferem de modo apreciável em 24 h (experiências 1 e 2, tabela 1) ou em 36 horas (dados não mostrados) após a transfecção. No entanto, um aumento maior do que 10 vezes em rendimentos do vírus com PR/ 8/34- PB1 foi verificado quando todas as proteínas estruturais de vírus de influenza foram providas (experiências 3 e 4, tabela 1). As controles negativos, que faltavam um dos plasmídeos para a expressão de PA, PB1, PB2, de proteínas NP, não

deu qualquer vírus (experiências 5-8, tabela 1). Assim, dependendo do vírus gerado, a expressão de todas as proteínas estruturais de vírus de Influenza A melhorou de modo apreciável a eficácia do método de genética reversa.

[00081] A seguir, a cinética da produção de vírus após transfecção de células foi determinada usando o conjunto de plasmídeos usados para gerar um vírus com o gene A/PR/8/34-PB1. Em duas das três experiências, um vírus foi primeiro detectado a 24 h após a transfecção. O título medido em um momento, $> 10^3$ pfu/ml, tinha aumentado a $> 10^6$ pfu/ml em 48 h após transfecção (tabela 2). Para avaliar a porcentagem de células transfectadas com plasmídeo que estavam produzindo vírus, células 293T foram tratadas com EDTA (0,02%) a 24 h após transfecção para dispersar as células, e então realizadas limitando estudos de diluição. Nesta experiência, não foi verificado vírus livre no sobrenadante de cultura neste ponto de tempo. Os resultados indicaram que 1 em 103,3 células estavam gerando partículas de vírus infeccioso.

Tabela 2 – Cinética de produção de vírus após a transfecção de plasmídeos em células 293T*

Horas após transfecção de plasmídeo	Títulos de vírus em sobrenadante de cultura (pfu/ml)		
	Experiência		
	1	2	2
6	0	ND	ND
12	0	ND	0
18	0	ND	0
24	0	2×10^3	6×10^3
30	ND	5×10^4	9×10^4
36	6×10^2	$> 1 \times 10^5$	7×10^5
42	ND	$> 1 \times 10^6$	5×10^6
48	8×10^4	$> 1 \times 10^6$	1×10^7

* células 293T foram com oito plasmídeos de RNA polimerase I codificando genes de vírus A/WSN/33 com a exceção de gene PB1, que é derivado de vírus A/PR/8/34 e nove plasmídeos de expressão de proteína como descrito no texto. Em pontos de tempo diferentes, os requerentes titularam vírus no sobrenadante de cultura em células MDCK. ND = não realizado.

[00082] A recuperação de vírus de influenza contendo o epítipo FLAG

na proteína NA. Para verificar que o novo sistema de genética reversa permitiu a introdução de mutações no genoma de vírus de influenza A, um vírus contendo um epítipo FLAG (Castrucci et al., 1992) na proteína NA foi gerado. Células 293T foram transfectadas com plasmídeo de RNA polimerase I (pPo1I-WSN-NA/FL79) que continham um cDNA codificando tanto a proteína NA como um epítipo FLAG no fundo da cabeça da proteína, junto com os plasmídeos de expressão de proteína e RNA polimerase I. Para confirmar que o vírus recuperado (PR8-WSN-FL79) de fato expressou a proteína NA-FLAG, os testes de imuno-coloração de células infectadas com os vírus de tipo selvagem PR8-WSN-FL79 ou A/WSN/33 foram realizados. Um anticorpo monoclonal para o epítipo FLAG detectou células infectadas com PR8-WSN-FL79, mas não as infectadas com o vírus de tipo selvagem. A recuperação do vírus PR8-WSN-FL79 foi tão eficaz como a de vírus de tipo selvagem não etiquetado (dados não mostrados). Estes resultados indicam que o novo sistema de genética reversa permite que se introduza mutações no genoma do vírus de influenza A.

[00083] Geração de vírus de influenza infeccioso contendo mutações no gene PA. Para produzir vírus possuindo mutações no gene PA, duas mutações silentes foram introduzidas criando novas sequências de reconhecimento para endonucleases de restrição (Bsp120I na posição 846 e pvuII na posição 1284 de mRNA). Previamente, não foi possível modificar este gene por genética reversa, devido à falta de um sistema de seleção confiável. Os vírus transfectantes, PA-T846C e PA-A1284, foram recuperados. Os vírus transfectantes recuperados foram biologicamente clonados por duas diluições limitativas consecutivas. Para verificar que os vírus recuperados foram de fato transfectantes com mutações no gene PA, cDNA de o gene PA foi obtido por PCR de transcriptase reversa. Os vírus PA-T846C e PA-A1284C tinham as mutações esperadas dentro do gene PA, como demonstrado pela presença de sítios de restrição recentemente

introduzidos. PCR das mesmas amostras virais e iniciadores sem a etapa de transfecção reversa falharem de produzir quaisquer produtos (dados não mostrados), indicando que o cDNA de PA foi de fato originado de vRNA em vez do plasmídeo usado para gerar os vírus. Estes resultados ilustram como vírus com genes mudados podem ser produzidos e recuperados sem o uso de vírus auxiliares.

Discussão

[00084] O sistema de genética reverso descrito aqui permite que se produza, de modo eficaz, vírus de influenza A completamente a partir de cDNAs clonados. Bridgen e Elliott (1996) também usaram genética reversa para gerar um vírus Bunyamwera (família *Bunyaviridae*), mas ele contém somente três segmentos de RNA de sentido negativo, e a eficácia de sua produção foi baixa, 10^2 pfu/ 10^7 células. Apesar dos rendimentos de vírus diferirem dentre as experiências, consistentemente $> 10^3$ pfu/ 10^6 células foram observados para vírus de influenza, que continha oito segmentos. Existem várias explicações para a elevada eficácia de sistema de genética reversa descrito acima. Em vez de produzir RNPs in vitro (Luytjes et al., 1989), RNPs foram gerados in vivo através de síntese intracelular de vRNAs usando RNA polimerase I e através de expressão acionada por plasmídeo das proteínas de polimerase viral e NP. Também, o uso de 293 T células, que foram prontamente transfectadas com plasmídeos (Goto et al., 1997), assegurou que uma grande população de células recebeu todos os plasmídeos necessários para a produção de vírus. Além disso, o número grande de transcritos produzidos por RNA polimerase I, que está dentre as enzimas mais abundantemente expressadas em células em cultura, provavelmente contribuiu para a eficácia global do sistema. Estes aspectos levam a um número correspondentemente abundante de transcritos de vRNA e quantidades alequeadas de proteína viral para encapsidação de vRNA, formação de RNPs no núcleo, e exportação destes complexos para a membrana da célula, onde

novos vírus são reunidos e liberados.

[00085] Os sistemas de genética reversa previamente estabelecidos (Enami et al., 1990; Neumann et al., 1994; Luytjes et al., 1989; Pleschka et al., 1996) requerem infecção de vírus auxiliar e, assim, métodos de seleção que permitem que um número pequeno de transfectantes seja recuperado dentre um vasto número de vírus auxiliares. Estas estratégias foram empregadas para gerar vírus de influenza que possuem um dos seguintes genes derivados de cDNA: PB2 (Subbarao et al., 1993), HA (Enami et al., 1991; Horimoto et al., 1994), NP (Li et al., 1995), NA (Enami et al., 1990), M (Castrucci et al., 1995; Yasuda et al., 1994), e NS (Enami et al., 1991). A maior parte dos métodos de seleção, exceto para os aplicáveis aos genes HA e NA, se baseiam na temperatura do crescimento, restrição da faixa de hospedeiro, ou sensibilidade a droga, assim limitando a utilidade de genética reversa para a análise funcional dos produtos de genes. Mesmo com os genes HA e NA, para os quais sistemas de seleção acionados por anticorpo confiável disponíveis, é difícil produzir vírus com defeitos de crescimento proeminentes. Em contraste, o sistema de genética reversa descrito aqui não requer vírus auxiliar e permite gerar transfectantes com mutações em qualquer segmento de gene ou com defeitos de crescimento severos. Tendo a tecnologia para introduzir qualquer mutação viável no genoma de vírus de influenza possibilita aos investigadores se dirigir a um número de aspectos antigos, como a natureza das sequências regulatórias em regiões não traduzidas do genoma viral, relações de estrutura- função de proteínas virais, e a base molecular de restrição de faixa de hospedeiro e patogenicidade viral.

[00086] Apesar das vacinas de influenza inativadas serem disponíveis, sua eficácia é sub-ótima devido, em parte, à sua capacidade limitada de elicitar respostas de células T citotóxicas e IgA local. As experiências clínicas de vacinas de influenza vivas adaptadas a resfriados agora em desenvolvimento sugerem que estas vacinas são atenuadas de modo ótimo, de

modo que elas não irão causar sintomas de influenza, mas irão ainda induzir uma imunidade protetora (Keitel & Piedra, 1998). No entanto, os resultados preliminares indicam que estas vacinas de vírus vivo não serão mais eficazes de modo significativo do que as melhores vacinas inativadas (estudado em Keitel & Piedra, 1998), deixando espaço para outra melhora. Uma possibilidade seria a modificação de vacina adaptada a resfriados com sistema de genética reversa acima mencionado. Alternativamente, pode-se iniciar com o uso de genética reversa para produzir uma cepa de influenza A “mestre” com mutações atenuantes múltiplas nos genes que codificam proteínas internas. A aplicação mais intrigante do sistema de genética reversa descrito aqui pode ser na produção rápida de vacinas de vírus vivo atenuadas em casos de uma suspeição de pandemias envolvendo novos subtipos HA ou NA de vírus de influenza.

[00087] Este novo sistema de genética reversa irá provavelmente melhorar o uso de vírus de influenza como vetores de vacina. Os vírus podem ser engenheirados para expressar proteínas estranhas ou epítomos imunogênicos além das proteínas virais de influenza. Pode-se, por exemplo, gerar vírus com proteínas estranhas como um nono segmento (Enami et al., 1991) e usar os mesmos como vacinas vivas. Não somente os vírus de influenza estimulam respostas imunes humorais e mediadas por células fortes, mas também eles dão uma ampla rede de proteínas HA e NA de superfície de virion (por exemplo 15 subtipos de HA e 9 de NA e suas variantes epidêmicas), permitindo imunização repetida da mesma população alvo.

[00088] Os VLPs de influenza possuindo um vRNA artificial codificando um gene repórter foram produzidos por expressão de proteínas estruturais virais e vRNA com o sistema de polimerase T7 de vacínia (Mena et al., 1996). Usando genética reversa, pode-se agora gerar VLPs contendo vRNAs que codificam proteínas requeridas para a transcrição e replicação de vRNA (isto é, PA, PB1, PB2, e NP), assim como vRNAs codificando

proteínas de interesse. Estes VLPs devem ser veículos de distribuição de genes utilizáveis. Como é importante, sua falta de genes codificando proteínas estruturais virais deve assegurar que os vírus infecciosos não serão produzidos após a terapia com gene VLP. Porque o genoma do vírus de influenza não é integrado no cromossomo do hospedeiro, o sistema VLP deve ser apropriado para terapia de genes em situações requerendo somente transdução a prazo curto de células (por exemplo para tratamento de câncer). Em contraste com os vetores de adenovírus (Kovesdi et al., 1997), VLPs de influenza devem conter tanto as variantes HA como NA, permitindo o tratamento repetido de populações alvo.

[00089] A família *Orthomyxoviridae* compreende vírus de influenza A, B, e C, assim como o Thogotovirus recentemente classificado. A estratégia para gerar vírus de influenza A infecciosos completamente a partir de cDNAs clonados descritos aqui deve ser aplicar a qualquer orthomyxovirus, e talvez a outros vírus de RNA de sentido negativo segmentados também (por exemplo, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*). A capacidade de manipular o genoma viral sem limitações técnicas tem implicações profundas para o estudo de ciclos de vida virais e sua regulação, a função de proteínas virais e os mecanismos moleculares de patogenicidade viral.

Exemplo 2

[00090] Para desenvolver um sistema de genética reversa para influenza A/ Puerto Rico/8/34, RNA viral foi extraído de fluido alantóico de A/Puerto Rico/8/24 (H1N1), variante de cultivo superior Madison (PR8HG), usando kit RNeasy Mini (Qiagen) de acordo com as instruções dos fabricantes. CDNA foi sintetizado usando MMLV-RTase (Promega) e iniciador Uni12. Os cDNAs foram amplificados durante a noite por PCR usando o seguinte:

Conjuntos de iniciador

PB1: Ba PB1-1 e PB1-1735R (fragmento frontal) e PB1-903 e Ba-PB1-

2341R (fragmento de fundo)

Ba-PB1-1 CACACACGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGCA (SEQ ID NO:9)

173PB1-1735R GGGTTTGTATTTGTGTGTCACC (SEQ ID NO:10)

233PB1-903 CCAGGACACTGAAATTTCTTTCAC (SEQ ID NO:11)

Ba-PB1-2341R

CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGCATTT (SEQ ID NO:12)

PB2: Ba PB2-1 e B2 1260R (fragmento frontal) e WSN PB2 seq-2 e Ba-PB2-

2341R (fragmento de fundo)

Ba-PB2-1 CACACAGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTC (SEQ ID NO:13)

B2 1260R CACACACGTCTCCATCATACAATCCTCTTG (SEQ ID NO:14)

WSN PB2 seq-2 CTCCTCTGATGGTGGCATAC (SEQ ID NO:15)

Ba-PB2-2341R

CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT (SEQ ID NO:16)

PA:

Bm-PA-1 CACACACGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTAC (SEQ ID NO:17)

Bm-PA-2233R

CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTACTT (SEQ ID NO:18)

HA:

Bm-HA-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGG (SEQ ID NO:19)

Bm-NS-890R:

CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID NO:20)

NP:

Bm-NP-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTA (SEQ ID NO:21)

Bm-NP-1565R
CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT (SEQ ID NO:22)

NA:

Ba-NA-1: CACACAGGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO:23)
Ba-NA-1413R:
CACACAGGTCTGGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT (SEQ ID NO:24)

M:

Bm-M-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGTAG (SEQ ID NO:25)
Bm-M-1027R
CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTTT (SEQ ID NO:26)

NS:

Bm-NS-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTG (SEQ ID NO:27)
Bm-NS-890R
CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID NO:28)

DNA polimerase: DNA polimerase nativo *pfu* (Stratagene)

[00091] Os produtos PCR foram separados por gel de eletroforese e extraídos de gel agarose usando um kit de extração de gel (Qiagen). Os genes extraídos foram ligados em vetor cego pT7blue (Novagen), usando um kit de ligação Takara var. II (Takara). Após 5 horas, os genes ligados foram transformados em JM109 (genes PB2, M, e NS) ou DH5alfa (PA, PB1, e NP). Seis colônias para cada gene foram cultivadas em TB durante 8 horas. Os plasmídeos foram extraídos de cultura de bactéria, e quatro clones por gene foram sequenciados.

[00092] Os genes PA, NP, M, e NS em pT7Blue foram excisados por enzima *Bsm* BI (New England Biolabs). O gene PB1 foi excisados por *Bsa* I (New England Biolabs). Os genes excisados foram ligados durante a noite com vetor pPo1IR que contém promotor de RNA polimerase I humano e o terminado de RNA polimerase I de camundongo que tinham sido digeridos com *Bsm* BI. O fragmento frontal do gene PB2 em pT7Blue foi excisado por *Bsr* GI (New England Biolabs) e *Bam* HI (Roche), e o fragmento de fundo foi excisado por *Bsr* GI (New England Biolabs) e *Spe* I (Roche). Os fragmentos

excisados foram misturados e digeridos por *Bsa* I. Após 6 horas, os genes digeridos foram purificados usando um kit de purificação PCR (Qiagen) e ligados durante a noite entre os sítios *Bsm* BI do vetor pPo1IR.

[00093] Os genes PB1, PA, NP, M, e NS-pPo1IR ligados foram usados para transformar JM109 (genes M e NS) ou DH5alfa (genes PB1, PA e NP) durante a noite. As colônias de bactéria transformadas foram cultivadas em LB durante a noite. O PB2-pPo1IR ligado foi usado para transformar JM109 durante a noite.

[00094] Os plasmídeos foram extraídos de culturas bacterianas e insertos de genes foram confirmados por digestão da enzima. As colônias de bactérias transformadas por PB2-Po1IR foram cultivadas em LB durante 8 horas. Os plasmídeos foram então extraídos e a inserção do gene foi confirmada pela digestão da enzima. Todas as construções pPo1I foram sequenciadas para assegurar que elas não continham mutações indesejadas.

[00095] As construções pPo1IR para PR8HG foram transfectadas em células de rim embrionário humano 293T com construções A/WSN/33(WSN)-HA e NA, A/Hong Kong/483/97(HK)-HAavir e NA, ou A/Kawasaki/01 (Kawasaki)-HA e NA Po1I e quatro construções de expressão de proteína para as proteínas de polimerase e NP de A/WNS/33. Os sobrenadantes de células 293T transfectadas foram diluídos em série (não diluídos a 10^{-7}) e infectados em cavidades alantóicas de ovos de galinha embrionados com 9 dias de idade. Os fluidos alantóicos dos ovos infectados foram coletados e seus títulos virais testados por teste HA (tabela 3).

Tabela 3

Vírus possuindo genes PR8 junto com os seguintes genes HA e NA	Título de HA (HAU/ml) de fluido alantóico de ovos inoculados com os sobrenadantes 293T diluídos a:							
	não diluído	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
WSN-HA NA	<1	<1	200	<1	<1	<1	<1	<1
HK-HAavir NA	100	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Kawasaki-HA NA	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

[00096] Amostras positivas para HA (vírus com WSN-HA a 10⁻² e vírus com HK-HAavir NA em não diluído) foram diluídos em série de 10⁻² a 10⁻⁸ e 100 ul de cada diluição foram infectados em ovos de galinha embrionados. Os fluidos alantóicos de ovos infectados foram coletados e seus títulos virais testados por teste HA (Tabela 4). A dose infecciosa de ovos a 50% (EID₅₀) de A/Puerto Rico /8/34 (H1N1) preparado a partir dos plasmídeos foi de 10^{10,33}/ ml, e o título de HA foi 1:3200.

[00097] Um vírus recombinante tendo os genes HA e NA de A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) e o restante dos genes de vírus de influenza tipo A de PR8HG foi preparado. O título do vírus recombinante foi de 10^{10,67} EID₅₀/ml, e o título HA foi 1:1600.

Tabela 4

Vírus possuindo genes PR8 junto com os seguintes genes HA e NA	título HA (HAU/ ml) em cada diluição						
	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
WSN-HA NA	160	40	40	320	40	640	<1
HK-HAavir NA	400	800	400	400	400	800	<1

Sequências de genes PR8:

PA

AGCGAAAGCA GGTACTGATC CAAAATGGAA GATTTTGTGC
 GACAATGCTT
 CAATCCGATG ATTGTCGAGC TTGCGGAAAA AACAATGAAA
 GAGTATGGGG
 AGGACCTGAA AATCGAAACA AACAAATTTG CAGCAATATG
 CACTCACTTG
 GAAGTATGCT TCATGTATTC AGATTTTCAC TTCATCAATG
 AGCAAGGCGA
 GTCAATAATC GTAGAACTTG GTGATCCAAA TGCACTTTTG
 AAGCACAGAT
 TTGAAATAAT CGAGGGAAGA GATCGCACAA TGGCCTGGAC
 AGTAGTAAAC
 AGTATTTGCA ACACTACAGG GGCTGAGAAA CCAAAGTTTC
 TACCAGATTT
 GTATGATTAC AAGGAGAATA GATTCATCGA AATTGGAGTA
 ACAAGGAGAG
 AAGTTCACAT ATACTATCTG GAAAAGGCCA ATAAAATTAA
 ATCTGAGAAA
 ACACACATCC ACATTTTCTC GTTCACTGGG GAAGAAATGG
 CCACAAAGGC
 AGACTACACT CTCGATGAAG AAAGCAGGGC TAGGATCAAA
 ACCAGACTAT
 TCACCATAAG ACAAGAAATG GCCAGCAGAG GCCTCTGGGA
 TTCCTTTCGT
 CAGTCCGAGA GAGGAGAAGA GACAATTGAA GAAAGGTTTG
 AAATCACAGG
 AACAATGCGC AAGCTTGCCG ACCAAAGTCT CCCGCCGAAC
 TTCTCCAGCC
 TTGAAAATTT TAGAGCCTAT GTGGATGGAT TCGAACCGAA
 CGGCTACATT
 GAGGGCAAGC TGTCTCAAAT GTCCAAAGAA GTAAATGCTA
 GAATTGAACC
 TTTTTTGAAA ACAACACCAC GACCACTTAG ACTTCCGAAT
 GGGCCTCCCT
 GTTCTCAGCG GTCCAAATTC CTGCTGATGG ATGCCTTAAA
 ATTAAGCATT
 GAGGACCCAA GTCATGAAGG AGAGGGAATA CCGCTATATG
 ATGCAATCAA
 ATGCATGAGA ACATTCTTTG GATGGAAGGA ACCCAATGTT
 GTTAAACCAC
 ACGAAAAGGG AATAAATCCA AATTATCTTC TGTCATGGAA
 GCAAGTACTG
 GCAGAACTGC AGGACATTGA GAATGAGGAG AAAATTCCAA
 AGACTAAAAA

TATGAAGAAA ACAAGTCAGC TAAAGTGGGC ACTTGGTGAG
 AACATGGCAC
 CAGAAAAGGT AGACTTTGAC GACTGTAAAG ATGTAGGTGA
 TTTGAAGCAA
 TATGATAGTG ATGAACCAGA ATTGAGGTCG CTTGCAAGTT
 GGATTCAGAA
 TGAGTTTAAC AAGGCATGCG AACTGACAGA TTCAAGCTGG
 ATAGAGCTCG
 ATGAGATTGG AGAAGATGTG GCTCCAATTG AACACATTGC
 AAGCATGAGA
 AGGAATTATT TCACATCAGA GGTGTCTCAC TGCAGAGCCA
 CAGAATACAT
 AATGAAGGGA GTGTACATCA ATACTGCCTT GCTTAATGCA
 TCTTGTGCAG
 CAATGGATGA TTTCCAATTA ATTCCAATGA TAAGCAAGTG
 TAGAACTAAG
 GAGGGAAGGC GAAAGACCAA CTTGTATGGT TTCATCATAA
 AAGGAAGATC
 CCACTTAAGG AATGACACCG ACGTGGTAAA CTTTGTGAGC
 ATGGAGTTTT
 CTCTCACTGA CCAAGACTT GAACCACATA AATGGGAGAA
 GTACTGTGTT
 CTTGAGATAG GAGATATGCT TATAAGAAGT GCCATAGGCC
 AGGTTTCAAG
 GCCCATGTTC TTGTATGTGA GAACAAATGG AACCTCAAAA
 ATTAAAATGA
 AATGGGGAAT GGAGATGAGG CGTTGCCTCC TCCAGTCACT
 TCAACAAATT
 GAGAGTATGA TTGAAGCTGA GTCCTCTGTC AAAGAGAAAAG
 ACATGACCAA
 AGAGTTCTTT GAGAACAAAT CAGAAACATG GCCCATTGGA
 GAGTCCCCCA
 AAGGAGTGGA GGAAAGTTCC ATTGGGAAGG TCTGCAGGAC
 TTTATTAGCA
 AAGTCGGTAT TCAACAGCTT GTATGCATCT CCACAACTAG
 AAGGATTTTC
 AGCTGAATCA AGAAAACATGC TTCTTATCGT TCAGGCTCTT
 AGGGACAACC
 TGGAACCTGG GACCTTTGAT CTTGGGGGGC TATATGAAGC
 AATTGAGGAG
 TGCCTGATTA ATGATCCCTG GGTTTTGCTT AATGCTTCTT
 GGTTCAACTC
 CTTCTTACA CATGCATTGA GTTAGTTGTG GCAGTGCTAC
 TATTTGCTAT
 CCATACTGTC CAAAAAAGTA CCTTGTTTCT ACT
 (SEQ ID NO:1)

PB1

AGCGAAAGCA GGCAAACCAT TTGAATGGAT GTCAATCCGA
 CCTTACTTTT CTAAAAAGTG CCAGCACAAA ATGCTATAAG
 CACAACTTTC
 CCTTATACTG GAGACCCTCC TTACAGCCAT GGGACAGGAA
 CAGGATACAC
 CATGGATACT GTCAACAGGA CACATCAGTA CTCAGAAAAG
 GGAAGATGGA
 CAACAAACAC CGAAACTGGA GCACCGCAAC TCAACCCGAT
 TGATGGGCCA
 CTGCCAGAAG ACAATGAACC AAGTGGTTAT GCCCAAACAG
 ATTGTGTATT
 GGAGGCGATG GCTTTCCTTG AGGAATCCCA TCCTGGTATT
 TTTGAAAAC
 CGTGTATTGA AACGATGGAG GTTGTTTCAGC AAACACGAGT
 AGACAAGCTG
 ACACAAGGCC GACAGACCTA TGAAGGACT CTAAATAGAA
 ACCAACCTGC
 TGCAACAGCA TTGGCCAACA CAATAGAAGT GTTCAGATCA
 AATGGCCTCA
 CGGCCAATGA GTCTGGAAGG CTCATAGACT TCCTTAAGGA
 TGTAATGGAG
 TCAATGAACA AAGAAGAAAT GGGGATCACA ACTCATTTC
 AGAGAAAGAG
 ACGGGTGAGA GACAATATGA CTAAGAAAAT GATAACACAG
 AGAACAATGG
 GTAAAAAGAA GCAGAGATTG AACAAAAGGA GTTATCTAAT
 TAGAGCATTG
 ACCCTGAACA CAATGACCAA AGATGCTGAG AGAGGGAAGC
 TAAAACGGAG
 AGCAATTGCA ACCCCAGGGA TGCAAATAAG GGGGTTTGTA
 TACTTTGTTG
 AGACACTGGC AAGGAGTATA TGTGAGAAAAC TTGAACAATC
 AGGGTTGCCA
 GTTGGAGGCA ATGAGAAGAA AGCAAAGTTG GCAAATGTTG
 TAAGGAAGAT
 GATGACCAAT TCTCAGGACA CCGAACTTTC TTTCACCATC
 ACTGGAGATA
 ACACCAAATG GAACGAAAAT CAGAATCCTC GGATGTTTTT
 GGCCATGATC
 ACATATATGA CCAGAAATCA GCCCGAATGG TTCAGAAATG
 TTCTAAGTAT
 TGCTCCAATA ATGTTCTCAA ACAAATGGC GAGACTGGGA
 AAAGGGTATA
 TGTTTGAGAG CAAGAGTATG AACTTAGAA CTCAAATACC
 TGCAGAAATG
 CTAGCAAGCA TCGATTGAA ATATTTCAT GATTCAACAA
 GAAAGAAGAT
 TGAAAAATC CGACCGCTCT TAATAGAGGG GACTGCATCA
 TTGAGCCCTG
 GAATGATGAT GGGCATGTTT AATATGTAA GCACTGTATT
 AGGCGTCTCC
 ATCCTGAATC TTGGACAAA GAGATACACC AAGACTACTT
 ACTGGTGGA

ATGAAGGGAT TCAAGCCGGA GTCGACAGGT TTTATCGAAC
 CTGTAAGCTA
 CTTGGAATCA ATATGAGCAA GAAAAAGTCT TACATAAACA
 GAACAGGTAC
 ATTTGAATTC ACAAGTTTTT TCTATCGTTA TGGGTTTGT
 GCCAATTTC
 GCATGGAGCT TCCCAGTTTT GGGGTGTCTG GGATCAACGA
 GTCAGCGGAC
 ATGAGTATTG GAGTTACTGT CATCAAAAAC AATATGATAA
 ACAATGATCT
 TGGTCCAGCA ACAGCTCAAA TGGCCCTTCA GTTGTTTCATC
 AAAGATTACA
 GGTACACGTA CCGATGCCAT ATAGGTGACA CACAAATACA
 AACCCGAAGA
 TCATTTGAAA TAAAGAACT GTGGGAGCAA ACCCGTTCCA
 AAGCTGGACT
 GCTGGTCTCC GACGGAGGCC CAAATTTATA CAACATTAGA
 AATCTCCACA
 TTCCTGAAGT CTGCCTAAAA TGGGAATTGA TGGATGAGGA
 TTACCAGGGG
 CGTTTATGCA ACCCACTGAA CCCATTTGTC AGCCATAAAG
 AAATTGAATC
 AATGAACAAT GCAGTGATGA TGCCAGCACA TGGTCCAGCC
 AAAACATGG
 AGTATGATGC TGTTGCAACA ACACACTCCT GGATCCCCAA
 AAGAAATCGA
 TCCATCTTGA ATACAAGTCA AAGAGGAGTA CTTGAGGATG
 AACAAATGTA
 CCAAAGGTGC TGCAATTTAT TTGAAAAATT CTTCCCCAGC
 AGTTCATACA
 GAAGACCAGT CGGGATATCC AGTATGGTGG AGGCTATGGT
 TTCCAGAGCC
 CGAATTGATG CACGGATTGA TTTCGAATCT GGAAGGATAA
 AGAAAGAAGA
 GTTCACTGAG ATCATGAAGA TCTGTTCCAC CATTGAAGAG
 CTCAGACGGC
 AAAAATAGTG AATTTAGCTT GTCCTTCATG AAAAATGCC
 TTGTTTCTAC
 T
 (SEQ ID NO:2)

PB2

AGCGAAAGCA GGTCAATTAT ATTCAATATG GAAAGAATAA
 AAGAACTACG
 AAATCTAATG TCGCAGTCTC GCACCCGCGA GATACTCACA
 AAAACCACCG
 TGGACCATAT GGCCATAATC AAGAAGTACA CATCAGGAAG
 ACAGGAGAAG
 AACCAGCAC TTAGGATGAA ATGGATGATG GCAATGAAAT
 ATCCAATTAC
 AGCAGACAAG AGGATAACGG AAATGATTCC TGAGAGAAAT
 GAGCAAGGAC
 AAACTTTATG GAGTAAAATG AATGATGCCG GATCAGACCG

AGTGATGGTA
 TCACCTCTGG CTGTGACATG GTGGAATAGG AATGGACCAA
 TAACAAATAC
 AGTTCATTAT CCAAAAATCT ACAAACCTTA TTTTGAAAGA
 GTCGAAAGGC
 TAAAGCATGG AACCTTTGGC CCTGTCCATT TTAGAAACCA
 AGTCAAAATA
 CGTCGGAGAG TTGACATAAA TCCTGGTCAT GCAGATCTCA
 GTGCCAAGGA
 GGCACAGGAT GTAATCATGG AAGTTGTTTT CCCTAACGAA
 GTGGGAGCCA
 GGATACTAAC ATCGGAATCG CAACTAACGA TAACCAAAGA
 GAAGAAAGAA
 GAACTCCAGG ATTGCAAAAT TTCTCCTTTG ATGGTTGCAT
 ACATGTTGGA
 GAGAGAACTG GTCCGCAAAA CGAGATTCCT CCCAGTGGCT
 GGTGGAACAA
 GCAGTGTGTA CATTGAAGTG TTGCATTGA CTCAAGGAAC
 ATGCTGGGAA
 CAGATGTATA CTCCAGGAGG GGAAGTGAGG AATGATGATG
 TTGATCAAAG
 CTTGATTATT GCTGCTAGGA ACATAGTGAG AAGAGCTGCA
 GTATCAGCAG
 ATCCACTAGC ATCTTTATTG GAGATGTGCC ACAGCACACA
 GATTGGTGGA
 ATTAGGATGG TAGACATCCT TAGGCAGAAC CCAACAGAAG
 AGCAAGCCGT
 GGATATATGC AAGGCTGCAA TGGGACTGAG AATTAGCTCA
 TCCTTCAGTT
 TTGGTGGATT CACATTTAAG AGAACAAGCG GATCATCAGT
 CAAGAGAGAG
 GAAGAGGTGC TTACGGGCAA TCTTCAAACA TTGAAGATAA
 GAGTGCATGA
 GGGATATGAA GAGTTCACAA TGGTTGGGAG AAGAGCAACA
 GCCATACTCA
 GAAAAGCAAC CAGGAGATTG ATTCAGCTGA TAGTGAGTGG
 GAGAGACGAA
 CAGTCGATTG CCGAAGCAAT AATTGTGGCC ATGGTATTTT
 CACAAGAGGA
 TTGTATGATA AAAGCAGTCA GAGGTGATCT GAATTTTCGTC
 AATAGGGCGA
 ATCAACGATT GAATCCTATG CATCAACTTT TAAGACATTT
 TCAGAAGGAT
 GCGAAAGTGC TTTTCAAAA TTGGGGAGTT GAACCTATCG
 ACAATGTGAT
 GGGAATGATT GGGATATTGC CCGACATGAC TCCAAGCATC
 GAGATGTCAA
 TGAGAGGAGT GAGAATCAGC AAAATGGGTG TAGATGAGTA
 CTCCAGCACG
 GAGAGGGTAG TGGTGAGCAT TGACCGTTTT TTGAGAATCC

GGGACCAACG
 AGGAAATGTA CTACTGTCTC CCGAGGAGGT CAGTGAAACA
 CAGGGAACAG
 AGAAACTGAC AATAACTTAC TCATCGTCAA TGATGTGGGA
 GATTAATGGT
 CCTGAATCAG TGTTGGTCAA TACCTATCAA TGGATCATCA
 GAAACTGGGA
 AACTGTTAAA ATTCAGTGGT CCCAGAACCC TACAATGCTA
 TACAATAAAA
 TGGAATTTGA ACCATTTTCA TCTTTAGTAC CTAAGGCCAT
 TAGAGGCCAA
 TACAGTGGGT TTGTAAGAAC TCTGTTCCAA CAAATGAGGG
 ATGTGCTTGG
 GACATTTGAT ACCGCACAGA TAATAAACT TCTTCCCTTC
 GCAGCCGCTC
 CACCAAAGCA AAGTAGAATG CAGTTCTCCT CATTTACTGT
 GAATGTGAGG
 GGATCAGGAA TGAGAATACT TGTAAGGGGC AATTCTCCTG
 TATTCAACTA
 TAACAAGGCC ACGAAGAGAC TCACAGTTCT CGGAAAGGAT
 GCTGGCACTT
 TAACTGAAGA CCCAGATGAA GGCACAGCTG GAGTGGAGTC
 CGCTGTCTG
 AGGGGATTCC TCATTCTGGG CAAAGAAGAC AAGAGATATG
 GGCCAGCACT
 AAGCATCAAT GAACTGAGCA ACCTTGCGAA AGGAGAGAAG
 GCTAATGTGC
 TAATTGGGCA AGGAGACGTG GTGTTGGTAA TGAAACGGAA
 ACGGGACTCT
 AGCATACTTA CTGACAGCCA GACAGCGACC AAAAGAATTC
 GGATGGCCAT
 CAATTAGTGT CGAATAGTTT AAAAACGACC TTGTTTCTAC T
 (SEQ ID NO:3)

NP

AGCAAAAGCA GGGTAGATAA TCACTCACTG AGTGACATCA
 AAATCATGGC GTCTCAAGGC ACCAAACGAT CTTACGAACA
 GATGGAGACT
 GATGGAGAAC GCCAGAATGC CACTGAAATC AGAGCATCCG
 TCGGAAAAAT
 GATTGGTGGA ATTGGACGAT TCTACATCCA AATGTGCACC
 GAACTCAAAC
 TCAGTGATTA TGAGGGACGG TTGATCCAAA ACAGCTTAAC
 AATAGAGAGA

ATGGTGCTCT CTGCTTTTGA CGAAAGGAGA AATAAATACC
 TTGAAGAACA
 TCCCAGTGCG GGGAAAGATC CTAAGAAAAC TGGAGGACCT
 ATATACAGGA
 GAGTAAACGG AAAGTGGATG AGAGAACTCA TCCTTTATGA
 CAAAGAAGAA
 ATAAGGCGAA TCTGGCGCCA AGCTAATAAT GGTGACGATG
 CAACGGCTGG
 TCTGACTCAC ATGATGATCT GGCATTCCAA TTTGAATGAT
 GCAACTTATC
 AGAGGACAAG AGCTCTTGTT CGCACCGGAA TGGATCCCAG
 GATGTGCTCT
 CTGATGCAAG GTTCAACTCT CCCTAGGAGG TCTGGAGCCG
 CAGGTGCTGC
 AGTCAAAGGA GTTGAACAA TGGTGATGGA ATTGGTCAGA
 ATGATCAAAC
 GTGGGATCAA TGATCGGAAC TTCTGGAGGG GTGAGAATGG
 ACGAAAAACA
 AGAATTGCTT ATGAAAGAAT GTGCAACATT CTCAAAGGGA
 AATTTCAAAC
 TGCTGCACAA AAAGCAATGA TGGATCAAGT GAGAGAGAGC
 CGGAACCCAG
 GGAATGCTGA GTTCGAAGAT CTCACTTTTC TAGCACGGTC
 TGCACTCATA
 TTGAGAGGGT CGGTTGCTCA CAAGTCCTGC CTGCCTGCCT
 GTGTGTATGG
 ACCTGCCGTA GCCAGTGGGT ACGACTTTGA AAGGGAGGGA
 TACTCTCTAG
 TCGGAATAGA CCCTTTCAGA CTGCTTCAA ACAGCCAAGT
 GTACAGCCTA
 ATCAGACCAA ATGAGAATCC AGCACACAAG AGTCAACTGG
 TGTGGATGGC
 ATGCCATTCT GCCGCATTG AAGATCTAAG AGTATTAAGC
 TTCATCAAAG
 GGACGAAGGT GCTCCCAAGA GGGAAAGCTT CCACTAGAGG
 AGTTCAAATT
 GCTTCCAATG AAAATATGGA GACTATGGAA TCAAGTACAC
 TTGAACTGAG
 AAGCAGGTAC TGGGCCATAA GGACCAGAAG TGGAGGAAAC
 ACCAATCAAC
 AGAGGGCATC TGCGGGCCAA ATCAGCATAC AACCTACGTT
 CTCAGTACAG
 AGAAATCTCC CTTTGTACAG AACAACCATT ATGGCAGCAT
 TCAATGGGAA
 TACAGAGGGG AGAACATCTG ACATGAGGAC CGAAATCATA
 AGGATGATGG
 AAAGTGCAAG ACCAGAAGAT GTGTCTTTCC AGGGGCGGGG
 AGTCTTCGAG
 CTCTCGGACG AAAAGGCAGC GAGCCCGATC GTGCCTTCCT
 TTGACATGAG
 TAATGAAGGA TCTTATTCT TCGGAGACAA TGCAGAGGAG
 TACGACAATT
 AAAGAAAAAT ACCCTTGTTT CTA
 (SEQ ID NO:4)

M

AGCAAAAGCA GGTAGATATT GAAAGATGAG TCTTCTAACC
 GAGGTCGAAA
 CGTACGTACT CTCTATCATC CCGTCAGGCC CCCTCAAAGC
 CGAGATCGCA
 CAGAGACTTG AAGATGTCTT TGCAGGGAAG AACACCGATC
 TTGAGGTTCT
 CATGGAATGG CTAAAGACAA GACCAATCCT GTCACCTCTG
 ACTAAGGGGA
 TTTTAGGATT TGTGTTACG CTCACCGTGC CCAGTGAGCG
 AGGACTGCAG
 CGTAGACGCT TTGTCCAAAA TGCCCTTAAT GGGAACGGGG
 ATCCAAATAA
 CATGGACAAA GCAGTTAAAC TGTATAGGAA GCTCAAGAGG
 GAGATAACAT
 TCCATGGGGC CAAAGAAATC TCACTCAGTT ATTCTGCTGG
 TGCACTTGCC
 AGTTGTATGG GCCTCATATA CAACAGGATG GGGGCTGTGA
 CCACTGAAGT
 GGCATTTGGC CTGGTATGTG CAACCTGTGA ACAGATTGCT
 GACTCCCAGC
 ATCGGTCTCA TAGGCAAATG GTGACAACAA CCAATCCACT
 AATCAGACAT
 GAGAACAGAA TGGTTTTAGC CAGCACTACA GCTAAGGCTA
 TGGAGCAAAT
 GGCTGGATCG AGTGAGCAAG CAGCAGAGGC CATGGAGGTT
 GCTAGTCAGG
 CTAGACAAAT GGTGCAAGCG ATGAGAACCA TTGGGACTCA
 TCCTAGCTCC
 AGTGCTGGTC TGAAAAATGA TCTTCTTGAA AATTTGCAGG
 CCTATCAGAA
 ACGAATGGGG GTGCAGATGC AACGGTTCAA GTGATCCTCT
 CACTATTGCC
 GCAAATATCA TTGGGATCTT GCACTTGACA TTGTGGATTC
 TTGATCGTCT
 TTTTTTCAA TGCATTTACC GTCGCTTTAA ATACGGACTG
 AAAGGAGGGC
 CTTCTACGGA AGGAGTGCCA AAGTCTATGA GGGAAGAATA
 TCGAAAGGAA
 CAGCAGAGTG CTGTGGATGC TGACGATGGT CATTTTGTCA
 GCATAGAGCT
 GGAGTAAAAA ACTACCTTGT TTCTACT
 (SEQ ID NO:5)

NS

AGCAAAAGCA GGGTGACAAA AACATAATGG ATCCAAACAC
 TGTGTCAAGC
 TTTTCAGGTAG ATTGCTTTCT TTGGCATGTC CGCAAACGAG
 TTGCAGACCA
 AGAACTAGGC GATGCCCCAT TCCTTGATCG GCTTCGCCGA
 GATCAGAAAT
 CCTTAAGAGG AAGGGGCAGT ACTCTCGGTC TGGACATCAA
 GACAGCCACA
 CGTGCTGGAA AGCAGATAGT GGAGCGGATT CTGAAAGAAG
 AATCCGATGA
 GGCATTAAA ATGACCATGG CCTCTGTACC TGCCTCGCGT
 TACCTAACTG
 ACATGACTCT TGAGGAAATG TCAAGGGACT GGTCCATGCT
 CATACCCAAG
 CAGAAAGTGG CAGGCCCTCT TTGTATCAGA ATGGACCAGG
 CGATCATGGA
 TAAGAACATC ATACTGAAAG CGAACTTCAG TGTGATTTTT
 GACCGGCTGG
 AGACTCTAAT ATTGCTAAGG GCTTTCACCG AAGAGGGAGC
 AATTGTTGGC
 GAAATTTTAC CATTGCCTTC TCTTCCAGGA CATACTGCTG
 AGGATGTCAA
 AAATGCAGTT GGAGTCCTCA TCGGAGGACT TGAATGGAAT
 GATAACACAG
 TTCGAGTCTC TGAAACTCTA CAGAGATTCG CTTGGAGAAG
 CAGTAATGAG
 AATGGGAGAC CTCCACTCAC TCCAAAACAG AAACGAGAAA
 TGGCGGGAAC
 AATTAGGTCA GAAGTTTGAA GAAATAAGAT GGTTGATTGA
 AGAAGTGAGA
 CACAAACTGA AGATAACAGA GAATAGTTTT GAGCAAATAA
 CATTTATGCA
 AGCCTTACAT CTATTGCTTG AAGTGGAGCA AGAGATAAGA
 ACTTTCTCGT
 TTCAGCTTAT TTAGTACTAA AAAACACCCT TGTTTCTACT
 (SEQ ID NO:6)

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAAATGAAGGCAAACCT
 ACTGGTCTGTATGTGCACTTGCAGCTGCAGAT
 GCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAATTCAACCGACAC
 TGTTGACACAGTACTCGAGAAGAATGTGACAGT
 GACACACTCTGTAACTGCTCGAAGACAGCCACAACGGAAAACCTAT
 GTAGATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGG
 GGAAATGTAAACATCGCCGGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAATGCGAC
 CCACTGCTTCCAGTGAGATCATGGTCCTACATT
 GTAGAAACACCAAACCTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTT
 CATCGACTATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTGAG
 CTCAGTGTATCATTCGAAAGATTGCAAATATTTCCCAAAGAAAGCT
 CATGGCCCAACCAACAACAAACGGAGTAACGG

CAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTA
 TGGCTGACGGAGAAGGAGGGCTCATACCCAAAG
 CTGAAAAATTCTTATGTGAACAAAAAGGGAAAGAAGTCCTTGACT
 GTGGGGTATTTCATCACCCGCCTAACAGTAAGGA
 ACAACAGAATCTCTATCAGAATGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGA
 CTTCAAATTATAACAGGAGATTTACCCCGGAAA
 TAGCAGAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTA
 TTAAGTGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATA
 ATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCACCAATGTATGCTTTTCGC
 ACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATCAC
 CTCAAACGCATCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGTCAAACACCCC
 TGGGAGCTATAAACAGCAGTCTCCCTTACCAGA
 ATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCCAAAATACGTCAGGAGT
 GCCAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGGAAC
 ATCCCGTCCATTCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCCGGTTTT
 ATTGAAGGGGGATGGACTGGAATGATAGATGG
 ATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAG
 CGGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAAACG
 GGATTACAAACAAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAATGAACATTCAA
 TTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAAATTA
 GAAAAAAGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTCT
 GGACATTTGGACATATAATGCAGAAATTGTTAGT
 TCTACTGGAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCCATGACTCAAATGTGA
 AGAATCTGTATGAGAAAAGTAAAAAGCCAATTAA
 AGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCTACCAC
 AAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGTAAGA
 AATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAA
 CAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAAATTGGAATC
 AATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTC
 ACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCA
 GTTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCT
 GAGATTAGAATTTTCAGAGATATGAGGAAAAAC
 ACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:7)

NA

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC
 CATTGGATCAATCTGTCTGGTAGTCGGACTAATT
 AGCCTAATATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCA
 TTCAATTCAAACCTGGAAGTCAAAACCATACTGG
 AATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAAAATAGCACCTGGGTAA
 AGGACACAACCTTCAGTGATATTAACCGGCAATT
 CATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAAT
 AGCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTT
 GTCATAAGAGAGCCCTTTATTTTCATGTTCTCACTTGGAATGCAGGACC
 TTTTTTCTGACCCAAGGTGCCTTACTGAATGA
 CAAGCATTCAAGTGGGACTGTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCT
 TAATGAGCTGCCCTGTCGGTGAAGCTCCGTCCC
 CGTACAATTCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTC
 ATGATGGCATGGGCTGGCTAACAATCGGAATT
 TCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTAATAACAACGGCAT

```

AATAACTGAAACCATAAAAAAGTTGGAGGAAGAA
AATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAAATGGTTCAT
GTTTTACTATAATGACTGATGGCCCGAGTGATG
GGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACT
AAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCTCAC
TATGAGGAATGTTCCCTGTTACCCTGATACCGGCAAAGTGATGTGTGT
GTGCAGAGACAATTGGCATGGTTCGAACCGGCC
ATGGGTGTCTTTTCGATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCT
GCAGTGGGGTTTTTCGGTGACAACCCGCGTCCCG
AAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGTATGTTGATGGAGCAAAC
GGAGTAAAGGGATTTTCATATAGGTATGGTAAT
GGTGTGGGATAGGAAGGACCAAAAGTCACAGTTCAGACATGGGTT
TGAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGA
GACTGATAGTAAGTTCTCTGTGAGGCAAGATGTTGTGGCAATGACTG
ATTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAAC
ATCCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTT
GAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAACA
ATCTGGACTAGTGCAGCAGCATTCTTTTGTGGCGTGAATAGTGAT
ACTGTAGATTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGA
GTTGCCATTGAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACTCCTTGTTT
CTACT (SEQ ID NO:8)

```

Exemplo 3

[00098] Vírus de influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1, HK213) replica sistemicamente em galinhas, causando infecção letal. Além disso, este vírus é letal para embriões de galinha. Assim, apesar de suas proteínas de superfície serem altamente relacionadas para os vírus de influenza de aves patogênicos atualmente em circulação, HK213 não pode ser usado como uma cepa de vacina, pois as tentativas para o seu cultivo em ovos de galinha embrionados resulta na produção de fluido alantóico de baixa qualidade. Além disso, o uso deste vírus altamente virulento na produção de vacinas não é seguro para trabalhadores encarregados da vacina. Para testar a possibilidade de usar A/PR/8/34 como uma cepa de vacina mestre, o sítio de clivagem do gene de hemaglutinina (HA) de HK213 (contendo aminoácidos básicos múltiplos) foi mudado de um fenótipo virulento para avirulento (de RERRRKKR (SEQ ID NO: 9) a —TETR). Um vírus contendo o gene HA mudado produziu uma infecção localizada, não letal, em galinhas. Além disso, o vírus mudado foi não letal para embriões de galinha. Assim, o crescimento de vírus mudado em ovos embrionados deu fluido alantóico de alta qualidade, e nesta forma atenuada, o vírus é seguro para produtores de vacinas.

[00099] Um vírus recombinante contendo os genes neuraminidase (NA) e HA mudado de HK213, e todos os genes restantes de vírus A/PR/8/34 (H1N1, HG-PR8) de alto título (exemplo 2) que cresce 10 vezes melhor do que outras cepas A/PR/8/34 PR8 em ovos (10^{10} EID₅₀/ml; título HA:1:8.000), foi gerado em ovos de galinha embrionados. Este vírus recombinante, que expressa proteínas de superfície relacionadas com o vírus de influenza aviário atualmente em circulação, cresceu em títulos elevados em ovos de galinha embrionados (figura 4). Assim, a substituição de genes HA e NA de HG-PR8 com os de uma cepa atualmente em circulação de vírus de influenza resultou em uma cepa de vacina que pode ser produzida com segurança, e demonstra o uso de PR8- HG como uma cepa de vacina mestre.

Referências

- Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, terceira edição, ADIS Press, Ltd., Williams e Wilkins, Baltimore, MD (1987).
- Aymard-Henry et al., Virology: A Practical Approach, Oxford IRL Press, Oxford, 119 - 150 (1985).
- Bachmeyer, Intervirology, 5: 260 (1975).
- Berkow et al., eds., The Merck Manual, décima sexta edição, Merck & Co., Rahway, NJ (1992).
- Bridgen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 15400 (1996).
- Castrucci et al., J. Virol., 66: 4647 (1992).
- Castrucci et al., J. Virol., 69: 2725 (1995).
- Conzelmann et al., J. Gen. Virol., 77: 381 (1996).
- Conzelmann et al., Trends Microbiol., 4: 386 (1996).
- Conzelmann, Annu. Rev. Genet., 32: 123 (1998).
- Cozelmann et al., J. Virol., 68: 713 (1994).
- Edwards, J. Infect. Dis., 169: 68 (1994).
- Enami et al., J. Virol., 65: 2711 (1991).

- Enami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 3802 (1990).
- Enami et al., Virology, 185: 291 (1991).
- Fodor et al., J. Virol., 73: 9679 (1999).
- Goto et al., Virology, 238: 265 (1997).
- Grand e Skehel, Nature, New Biology, 238: 145 (1972).
- Hatta et al., Science, 293: 1840 (2001).
- Horimoto et al., J. Virol., 68: 3120 (1994).
- Huddleston et al., Nucl. Acids Res., 10: 1029 (1982).
- Keitel et al., in Textbook of Influenza, eds. Nickolson, K. G., Webster, R. G., e Hay, A. (Blackwell, Oxford), pp. 373 - 390 (1998).
- Kendal et al., Infect. Immunity, 29: 966 (1980).
- Kilbourne, Bull. M2 World Health Org., 41: 653 (1969).
- Kovesdi et al., J. Curr. Opin. Biotechnol., 8: 583 (1997).
- Laver & Webster, Virology, 69: 511 (1976).
- Lawson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 4477 (1995).
- Li et al., Virus Res., 37: 153 (1995).
- Luytjes et al., Cell, 59: 1107 (1989).
- Marriott et al., Adv. Virus Res., 53: 321 (1999).
- Mena et al., J. Virol., 70: 5016 (1996).
- Mizrahi, (ed.), Viral Vaccines, Wiley-Liss, New York, 39 - 67 (1990).
- Murphy, Infect. Dis. Clin. Pract., 2: 174 (1993).
- Muster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5177 (1991).
- Munoz et al., Antiviral Res., 46: 91 (2000).
- Nagai et al., Microbiol. Immunol., 43: 613 (1999).
- Nagai, Rev. Med. Virol., 9: 83 (1999).
- Neumann et al., Adv. Virus Res., 53: 265 (1999).
- Neumann et al., J. Gen. Virol., 83: 2635 (2002).
- Neumann et al., J. Virol., 71: 9690 (1997).
- Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96: 9345 (1999).

- Neumann et al., Virology, 202: 477 (1994).
- Neumann et al., Virology, 287: 243 (2001).
- Niwa et al., Gene, 108: 193 (1991).
- Ogra et al., J. Infect. Dis., 134: 499 (1977).
- Osol (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324 - 1341 (1980).
- Parks et al., J. Virol., 73: 3560 (1999).
- Pekosz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96: 8804 (1999).
- Perez et al., Virology, 249: 52 (1998).
- Pleschka et al., J. Virol., 70: 4188 (1996).
- Radecke et al., EMBO J., 14: 5773 (1995).
- Roberts et al., Virology, 247: 1 (1998).
- Robertson et al., Biologicals, 20: 213 (1992).
- Robertson et al., Giornale di Igiene e Medicina Preventiva, 29: 4 (1988).
- Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 14998 (1996).
- Schnell et al., EMBO J., 13: 4195 (1994).
- Subbarao et al., J. Virol., 67: 7223 (1993).
- World Health Organization TSR No. 673 (1982).

[000100] Todas publicações, patentes e pedidos de patentes são incorporadas aqui por referência. Apesar de no relatório acima esta invenção ter sido descrita com relação a algumas formas de realização preferidas da mesma, e muitos detalhes terem sido especificados para fins de ilustração, será evidente para os versados na arte que a invenção é susceptível de formas de realização adicionais e que alguns dos detalhes aqui descritos podem ser variados de modo considerável sem sair dos princípios básicos da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para a produção de vírus recombinante reagrupante de título elevado compreendendo uma pluralidade de vetores de vírus influenza, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) vetores para produção de vRNA compreendendo um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PB2 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição e um (vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NS de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, em que o cDNA de PB1 inclui a SEQ ID NO: 2 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 42, em que o cDNA de PB2 inclui a SEQ ID NO: 3 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 43, em que o cDNA de PA inclui a SEQ ID NO: 1 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 41, em que o cDNA de NP inclui a SEQ ID NO: 4 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmopolipeptídeo tendo a SEQ ID

NO: 44, em que o cDNA de M inclui a SEQ ID NO: 5 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 45 e 46, em que o cDNA de NS inclui a SEQ ID NO: 6 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 47 e 48, em que o cDNA de NA é derivado de um isolado de influenza diferente de PR8, em que o cDNA de HA é um H5 HA e em que os vetores de a) compreendem um promotor de RNA polimerase I e um terminador de RNA polimerase I; e

b) vetores para produção de mRNA compreendendo um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica PA de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica PB1 de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA codificando PB2 de vírus influenza, e um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica NP de vírus influenza.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que os vetores de b) incluem ainda um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica HA de vírus da influenza, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica NA de vírus da influenza; um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica M1 de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica M2 de vírus influenza; ou um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica NS2 de vírus influenza.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o promotor de RNA polimerase I é um promotor de RNA

polimerase I humano.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que todos os vetores de a) compreendem um promotor de RNA polimerase II.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que cada vetor de a) está em um plasmídeo separado.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que cada vetor de b) está em um plasmídeo separado.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que cada um dos vetores de b) ainda compreende uma sequência de terminação de transcrição de RNA.

8. Composição de acordo com a reivindicação 8 ou 9, ainda caracterizada pelo fato de compreender um vetor compreendendo um promotor ligado a sequências de vírus de influenza 5' compreendendo sequências de não codificação de vírus de influenza 5' ligadas a um cDNA de interesse ligado a sequências de vírus de influenza 3' compreendendo sequências de não codificação de vírus de influenza 3' ligadas a uma sequência de terminação de transcrição.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o cDNA de interesse está na orientação senso.

10. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o cDNA de interesse está na orientação anti-senso.

11. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o cDNA de interesse compreende uma matriz de leitura aberta codificando um polipeptídeo ou peptídeo imunogênico de um patógeno ou um peptídeo ou polipeptídeo terapêutico.

12. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o cDNA de interesse compreende um quadro de

leitura aberto codificando um polipeptídeo ou peptídeo imunogênico de um patógeno.

13. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o cDNA de H5 HA é um mutante H5 com um local de clivagem avirulento.

14. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o cDNA de interesse compreende um quadro de leitura aberto que codifica um polipeptídeo ou peptídeo terapêutico.

15. Método para preparar vírus de influenza, caracterizado pelo fato de que compreende: contatar uma célula *in vitro* com a composição como definida na reivindicação 1 em uma quantidade eficaz para produzir vírus de influenza infeccioso.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ainda compreender isolar o vírus.

17. Método para preparar um veículo de liberação de genes, caracterizado pelo fato de que compreende: contatar células *in vitro* com a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 8 a 11 em uma quantidade eficaz para produzir vírus de influenza compreendendo as sequências correspondentes ao cDNA de interesse, e isolar o vírus.

18. Método para preparar vírus de influenza, caracterizado pelo fato de que compreende contatar uma célula *in vitro* com um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PA de vírus influenza, ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de PB2 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um

cDNA de HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um cDNA de NS de vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando PA de vírus influenza, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando PB1 de vírus influenza, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando PB2 de vírus influenza, e um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando NP de vírus influenza, de modo a produzir vírus infeccioso reagrupante, em que o cDNA de PB1 inclui a SEQ ID NO: 2 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO:42, em que o cDNA de PB2 inclui a SEQ ID NO: 3 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 43, em que o cDNA de PA inclui a SEQ ID NO: 1 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 41, em que o cDNA de NP inclui a SEQ ID NO: 4 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 44, em que o cDNA de M inclui a SEQ ID NO: 5 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 45 e 46, em que o

cDNA de NS inclui a SEQ ID NO: 6 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 47 e 48, em que o cDNA de NA é derivado de um isolado de influenza diferente de PR8, em que o cDNA de HA é um H5 HA e em que os vetores para a produção de vRNA compreendem um promotor de RNA polimerase I e um terminador de RNA polimerase I.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de ainda compreender um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando HA de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando um NA de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando vírus de influenza M1, um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando vírus de influenza M2, e um vetor compreendendo um promotor ligado de modo operativo a um segmento de DNA codificando vírus de influenza NS2.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de ainda compreender um vetor compreendendo um promotor ligado a sequências de vírus de influenza 5' compreendendo sequências 5' não codificantes de vírus de influenza ligadas a um cDNA de interesse ou um fragmento do mesmo ligado a sequências 3' de vírus de influenza compreendendo sequências 3' não codificantes de vírus de influenza ligadas a uma sequência de terminação de transcrição.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o cDNA de interesse compreende uma matriz de leitura aberta codificando um polipeptídeo ou peptídeo imunogênico de um patógeno ou um polipeptídeo ou peptídeo terapêutico.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o cDNA de interesse está na orientação senso.

23. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o cDNA de interesse está na orientação anti-senso.

24. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que compreende ainda isolar o vírus.

25. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o cDNA de interesse compreende um quadro de leitura aberto que codifica um polipeptídeo ou peptídeo imunogênico de um patógeno.

26. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o cDNA de interesse compreende um quadro de leitura aberto que codifica um polipeptídeo ou peptídeo terapêutico.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 15, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o cDNA de H5 HA é um mutante H5 com um local de clivagem avirulento.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o título do reagrupante é pelo menos 10^{10} EID₅₀/mL.

29. Vírus, caracterizado pelo fato de ser obtido pelo método de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 28.

30. Composição para a produção de vírus recombinante reagrupante de título elevado compreendendo uma pluralidade de vetores de vírus influenza, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) vetores para produção de vRNA compreendendo um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PB2 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA

de HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição e um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NS do vírus da influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, em que o cDNA de PB1 inclui a SEQ ID NO: 2 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 42, em que o cDNA de PB2 inclui a SEQ ID NO: 3 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 43, em que o cDNA de PA inclui a SEQ ID NO: 1 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 41, em que o cDNA de NP inclui a SEQ ID NO: 4 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 44, em que o cDNA de M inclui a SEQ ID NO: 5 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 45 e 46, em que o cDNA de NS inclui a SEQ ID NO: 6 e suas sequências degeneradas que codificam um polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 47 e 48, em que o cDNA de NA e o cDNA de HA são derivados de um isolado de influenza diferente de PR8; e

b) vetores para produção de mRNA compreendendo um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica o PA de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica a PB1 de vírus influenza, um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA codificar a PB2 de vírus

influenza, ou um vetor compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica a NP de vírus influenza; em que as sequências nos vetores para a produção de vRNA são aquelas para um vírus influenza recombinante.

31. Método para preparar vírus de influenza, caracterizado pelo fato de que compreende contatar uma célula com um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PB1 de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de PB2 de vírus de influenza ligado a uma sequência de terminação de transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de HA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NP de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NA de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo uma operação de promotor ligado a um cDNA de M de vírus influenza ligado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor para produção de vRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um cDNA de NS de vírus influenza vinculado a uma sequência de terminação da transcrição, um vetor para produção de mRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica PA de vírus influenza, um vetor para produção de mRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica PB1 de vírus

de influenza, um vetor para produção de mRNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica PB2 de vírus de influenza e um vetor para mRNA produção compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um segmento de DNA que codifica NP de vírus influenza, de modo a produzir vírus recombinante infeccioso, em que o cDNA de PB1 inclui a SEQ ID NO: 2 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 42, em que o cDNA de PB2 inclui a SEQ ID NO: 3 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 43, em que o cDNA de PA inclui a SEQ ID NO: 1 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 41, em que o cDNA de NP inclui a SEQ ID NO: 4 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo a SEQ ID NO: 44, em que o cDNA de M inclui a SEQ ID NO: 5 e suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 45 e 46, em que o cDNA de NS inclui a SEQ ID NO: 6 e suas sequências que codificam o mesmo polipeptídeo tendo as SEQ ID NOs: 47 e 48, em que o cDNA de NA e o cDNA de HA são derivados de um isolado de influenza diferente de PR8.

32. Vírus, caracterizado pelo fato de que é obtido pelo método como definido na reivindicação 31.

33. Composição de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o promotor da RNA polimerase I é um promotor da RNA polimerase I humana.

34. Método para preparar vírus de influenza, caracterizado pelo fato de que compreende: contatar uma célula *in vitro* com a composição como definida na reivindicação 30, em uma quantidade eficaz para produzir o vírus influenza infeccioso.

35. Composição de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de compreender ainda um vetor compreendendo um

promotor ligado a sequências 5' de vírus influenza compreendendo sequências não codificadoras 5' do vírus da influenza ligadas a um cDNA de interesse ligado a sequências 3' de vírus influenza compreendendo sequências 3' não codificadoras do vírus influenza vinculadas a uma transcrição sequência de terminação.

36. Método para preparar um veículo de liberação de genes, caracterizado pelo fato de que compreende: contatar células *in vitro* com uma composição como definida na reivindicação 35, em uma quantidade eficaz para produzir vírus influenza compreendendo sequências correspondentes ao cDNA de interesse e isolando o vírus.

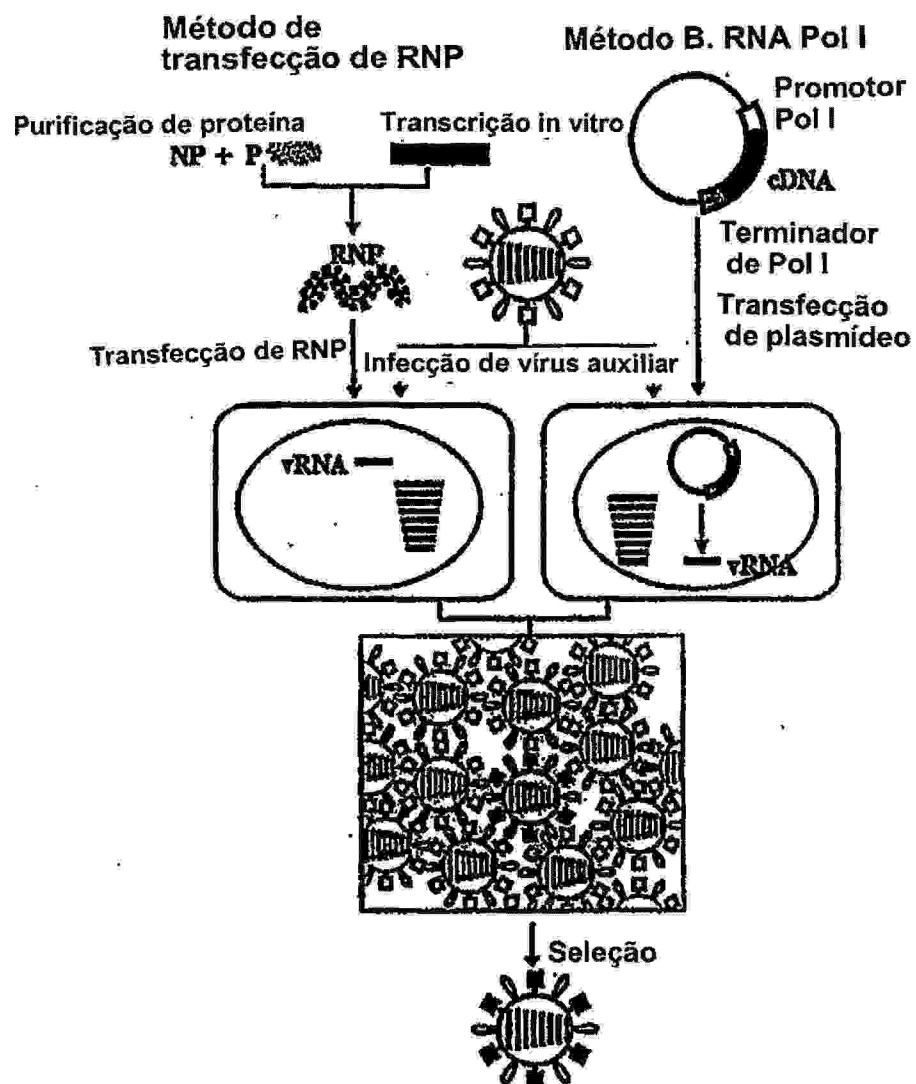


Fig. 1

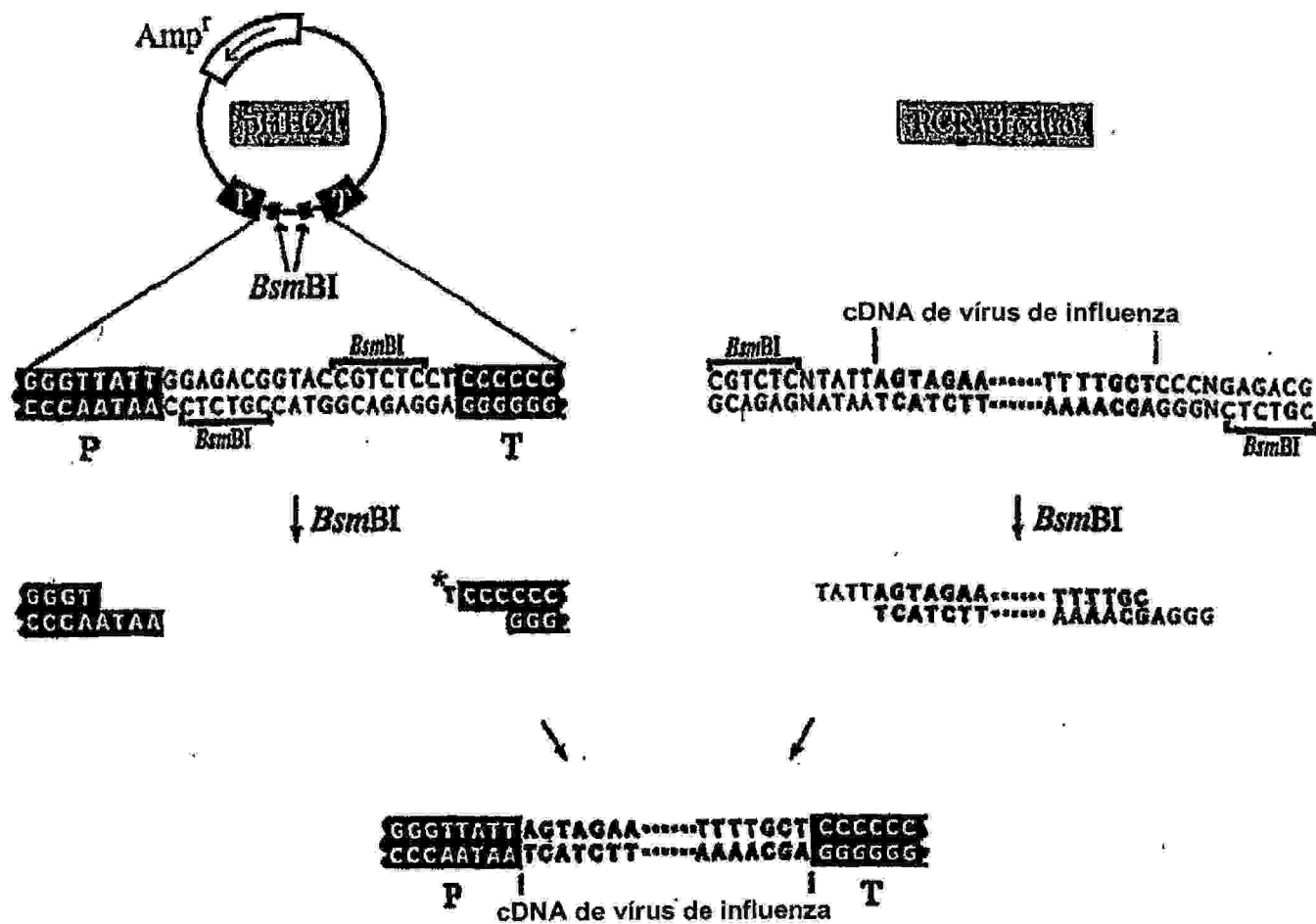
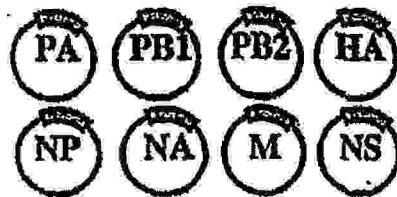


Fig. 2

Plasmídeos expressando
vRNA de influenza



Plasmídeos expressando
proteínas virais de influenza

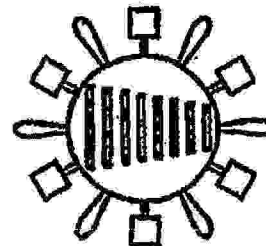
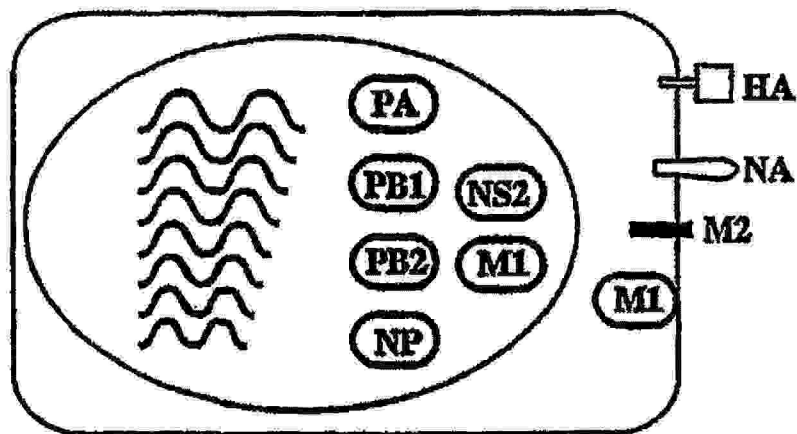
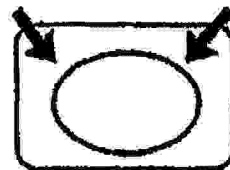
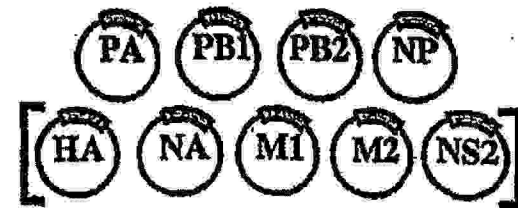
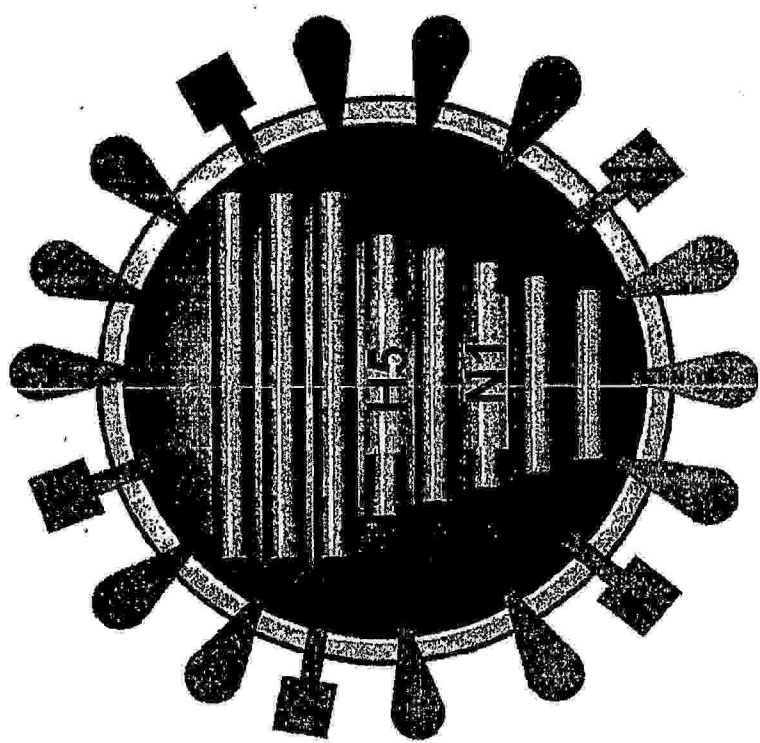


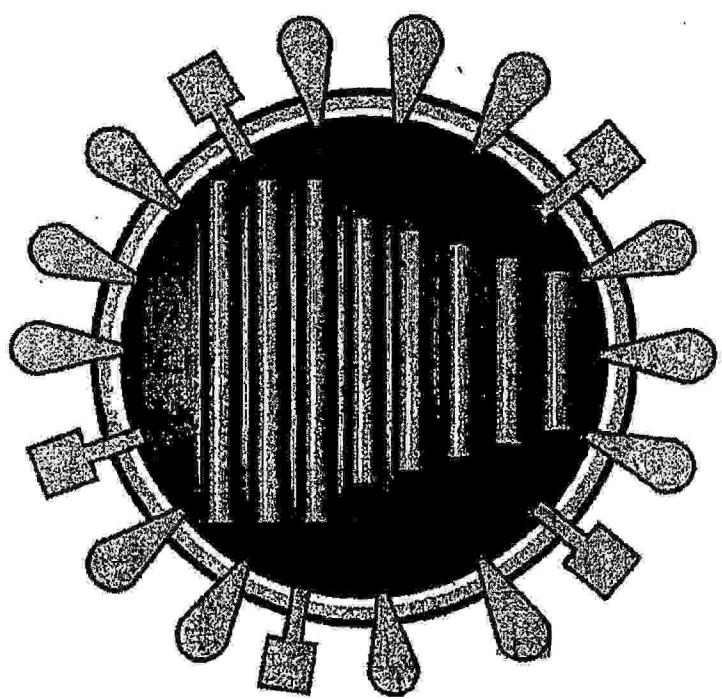
Fig. 3

H5N1-PR8



10^{10} EID₅₀/ml
Título HÁ: 1: 3,200

A/PR/8/34(H1N1)



10^{10} EID₅₀/ml
Título HÁ: 1:8,000