(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 278 621**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **00946097 .3**
(86) Fecha de presentación : **14.07.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1194580**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

(54) Título: **Reconstitución *in vitro* de virus ARN segmentados de polaridad negativa.**

(30) Prioridad: **14.07.1999 US 143645 P**
16.07.1999 GB 9916794

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

(73) Titular/es: **Mount Sinai School of Medicine of New York University**
1 Gustave L. Levy Place
New York, New York 10029, US

(72) Inventor/es: **Brownlee, George, Gow;**
Fodor, Ervin;
Palese, Peter y
García-Sastre, Adolfo

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Reconstitución *in vitro* de virus ARN segmentados de polaridad negativa.

La presente invención se refiere a la reconstitución (rescate) de virus ARN segmentados de polaridad negativa en células cultivadas a partir de ADN recombinantes. Más particularmente, por ejemplo se refiere al rescate de tales virus que tienen más de 3 segmentos genómicos de ARNv, especialmente, por ejemplo, los virus influenza que tienen generalmente 8 segmentos genómicos de ARNv, mediante un sistema dirigido completamente por vectores, lo que evita la necesidad de un virus cooperador ("helper").

Los últimos cinco años han sido testigos del rescate de la mayoría de los virus ARN no segmentados de polaridad negativa importantes a partir de ADN recombinante. En primer lugar, Schnell *et al*. tuvieron éxito en la recuperación del virus de la rabia a partir de ADN recombinante (EMBO J. (1994) 13, 4195-4203). Poco después, se desarrollaron sistemas de rescate basados en plásmidos para el virus de la estomatitis vesicular (Lawson *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 4477-4481; Whelan *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 8388-8392), virus respiratorio sincitial (Collins *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 11563-11567; Jin *et al*., Virology (1998)251, 206-214), virus del sarampión (Radecke *et al*., EMBO J. (1995) 14, 5773-5784) y virus Sendai (Garcin *et al*., EMBO J. (1995) 14, 6087-6094; Kato *et al*., Genes Cells (1996) 1, 569-579). Más recientemente, se han desarrollado sistemas de rescate basados en plásmidos para el virus parainfluenza humano tipo 3 (Durbin *et al*., Virology (1997) 235, 323-332; Hoffman y Banerjee, J. Virol. (1997) 71, 4272-4277), virus de la peste bovina (Baron y Barrett, J. Virol. (1997) 71, 1265-1271), virus de simio 5 (He *et al*., Virology (1997) 237, 249-260), virus respiratorio sincitial bovino (Buchholz *et al*., J. Virol. (1999) 73, 251-259) y virus de la enfermedad de Newcastle (Peeters *et al*., J. Virol. (1999) 73, 5001-5009).

Bridgen y Elliott (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 14, 15400-15404) han notificado el rescate sin virus cooperador de un bunyavirus que tiene sólo 3 segmentos genómicos de ARNv a partir de ADNc mediante la expresión de ARN anti-genoma y proteínas virales bajo el control de un promotor del bacteriófago T7. Sin embargo, hasta ahora no se ha sabido si una estrategia basada totalmente en plásmidos puede aplicarse satisfactoriamente para rescatar virus ARN segmentados de polaridad negativa con un mayor número de segmentos de ARNv, tales como el virus influenza, sin la ayuda de un virus cooperador.

La gripe sigue siendo una amenaza mundial constante para la salud en seres humanos y, por tanto, hay una necesidad particular para un método listo para generar virus influenza modificados con mutaciones conocidas en cualquiera de los segmentos genómicos del ARNv. La obtención mediante ingeniería genética de los segmentos de ARNv del virus influenza para la expresión de secuencias heterólogas también es de gran interés, por ejemplo, en el desarrollo de nuevas vacunas eficaces contra el virus influenza y un segundo agente patógeno. Se conocen tres tipos de virus influenza designados como los tipos A, B y C. Hasta ahora, el virus de la influenza A ha sido el principal centro de atención en lo que se refiere a la manipulación genética. El genoma de un virus influenza A de tipo natural consiste en 8 segmentos de ARN de sentido negativo de cadena sencilla que codifica para 10 polipéptidos: las proteínas ARN polimerasas dependientes de ARN (PB 1, PB2, y PA), la nucleoproteína (NP), las proteínas de la matriz (M1, M2), dos glucoproteínas de superficie que se proyectan desde la envuelta lipoproteica (hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA)) y las proteínas no estructurales NS1 y NS2. Las proteínas HA, NA, NP y polimerasa se codifican por segmentos genómicos monocistrónicos.

En cuanto a otros virus ARN segmentados de polaridad negativa, durante el ciclo de replicación de un virus influenza, el genoma viral se transcribe a ARNm y se replica a ARN complementario (ARNc). Para esto, es necesario que los segmentos genómicos de ARNv formen complejos con la nucleoproteína y la ARN polimerasa dependiente de ARN en complejos de ribonucleoproteína (RNP) (Huang *et al*., J. Virol. (1990) 64, 5669-5673; García-Sastre, Trends In Biotechnology (1998) 16, 230-235). Inicialmente, con el fin de manipular el genoma de un virus influenza, las RNP se reconstituyeron *in vitro* de ARN transcrito a partir de ADN de plásmido en presencia de las proteínas polimerasas PB1, PB2 y PA y la nucleoproteína aislada del virus influenza purificado (Enami *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 3802-3805; Enami y Palese, J. Virol. (1991) 65, 2711-2713; Muster y García-Sastre, Genetic manipulation of influenza viruses in Textbook of influenza (1998), capítulo. 9, eds. Nicholson *et al*.). Las RNP reconstituidas *in vitro* se transfectaron en células infectadas con un virus influenza cooperador, que proporcionó los segmentos de ARN y las proteínas virales requeridas restantes, dando como resultado la generación de virus transfectantes. Esta técnica ha sido extremadamente útil en el avance de la comprensión de la biología molecular y la patogenicidad de los virus influenza. Sin embargo, se basa en métodos de selección altamente especializados para aislar los virus transfectantes del virus cooperador, lo que limita su uso a ciertos segmentos de ARN de un número limitado de cepas virales.

Más recientemente, se ha demostrado que es posible la reconstitución intracelular de un complejo de RNP a partir de un segmento de ARNv transcrito intracelularmente utilizando proteínas polimerasas y NP expresadas en plásmidos (Neumann *et al*., Virology (1994) 202, 477-479; Zhang y Air, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 200, 95-101; Pleschka *et al*., J. Virol. (1996) 70, 4188-4192). Por ejemplo, Pleschka *et al*. demostraron que PB 1, PB2, PA y NP del virus influenza A expresadas a partir de plásmidos podían encapsidarse, transcribirse y replicar un ARN similar al ARNv del virus influenza que contiene un gen indicador ("reporter") de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en células 293 humanas transfectadas. Este gen indicador similar al ARNv se introdujo en las células huésped escogidas mediante la transfección de ADN de plásmido (pPOLI-CAT-RT) que tiene un promotor truncado de la ARN polimerasa I humana (nucleótidos -250 a -1) colocado en el sentido de 5' de la región codificante del ARNv. La secuencia de

la ribozima genómica del virus de la hepatitis delta se colocó en el sentido de 3' de la región codificante del ARNv con el fin de garantizar el procesamiento del ARN para dar el extremo 3' correcto del ARNv transcrito. El mismo grupo también notificó que sustituyendo el plásmido que codifica para el indicador de la CAT por un plásmido que codifica para un segmento de ARNv del virus influenza A auténtico, podrían rescatarse complejos de RNP reconstituidos intracelularmente en virus transfectados con la infección de las células transfectadas con un virus influenza cooperador. Pleschka *et al*. investigaron un sistema de rescate de este tipo basado en un virus cooperador, empleando segmentos de ARNv de NA del virus influenza A mutante transcritos intracelularmente. Sin embargo, volviendo a un sistema de rescate basado enteramente en plásmidos para el virus influenza, surgen nuevas consideraciones en lo que se refiere a obtener la expresión adecuada de todas las secuencias requeridas y la cooperación correcta de estas secuencias para ensamblar un virus completo.

Brigen y Elliot fueron incapaces de rescatar el bunyavirus *Bunyamwera* usando plásmidos que dirigen la expresión de segmentos genómicos de ARNv más que ARN anti-genoma. Sin embargo, se ha descubierto que el rescate sin virus cooperador de un virus influenza A en cultivo celular es factible mediante contransfección en células cultivadas de 12 plásmidos que pueden coexpresar 8 segmentos de ARNv y las proteínas NP y 3 ARN polimerasas necesarias para la formación de complejos de RNP. Puede extrapolarse esta misma estrategia a una variedad de otros virus ARN segmentados de polaridad negativa que tienen un gran número de segmentos genómicos de ARNv, por ejemplo 6 o más, incluyendo, por ejemplo virus influenza de otros tipos y otros miembros de la familia *Orthomyxoviridae* tales como los thogotovirus que contienen 6 segmentos de ARNv. Mientras que los virus de tipo natural tanto influenza A como influenza B tienen 8 segmentos de ARNv, se ha descrito que los virus influenza A modificados contienen un segmento de ARNv adicional (Enami *et al*., Virology (1993) 185, 765-90) y los virus influenza C tienen un segmento de ARNv menos.

Sumario de la invención

Así la presente invención proporciona un método para generar partículas virales infecciosas de un virus ARN segmentado de polaridad negativa que tienen más de 3 segmentos genómicos de ARNv, comprendiendo dicho método:

> introducir en células cultivadas vectores de expresión que expresan en dichas células los segmentos genómicos de ARNv completo de dicho virus, o los correspondientes ARNc completos de dicho virus, en el que dichas células soportan el crecimiento de dicho virus, proporcionando también dichas células una nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN, mediante lo cual se forman los complejos de RNP que contienen los segmentos genómicos de ARNv de dicho virus y se producen dichas partículas virales infecciosas por dichas células en ausencia de un virus cooperador y en el que dichas células no producen interferón.

Adicionalmente, las células huésped escogidas pueden, por ejemplo, tener introducidos uno o más vectores de expresión adicionales que pueden dirigir la expresión en las células de una o más de las proteínas virales necesarias. Por ejemplo, puede emplearse un segundo conjunto de vectores de expresión para expresar en las células huésped todas las subunidades de polimerasa dependiente de ARN y nucleoproteína. Convenientemente, por ejemplo, puede usarse un vector de expresión diferente para cada una de esas proteínas. Alternativamente, las células huésped elegidas pueden, por ejemplo, obtenerse por ingeniería genética para expresar una o más de las subunidades de ARN polimerasa dependiente de ARN y nucleoproteína necesarias. Si todas las proteínas esenciales para la encapsidación, transcripción y replicación de los ARNv se proporcionan mediante las células huésped de partida, entonces se apreciará que sólo se necesita el primer conjunto de vectores de expresión. Es más, las células huésped de partida elegidas pueden ser células obtenidas por ingeniería genética para expresar uno o más de los segmentos genómicos de ARNv del virus deseado. Por medio de un método de la invención, se apreciará que el rescate de un virus ARN segmentado de polaridad negativa puede lograrse sin ninguna asistencia viral, por ejemplo mediante un método totalmente basado en plásmidos.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para generar en células cultivadas partículas virales infecciosas de un virus segmentado de polaridad negativa, comprendiendo dicho método:

> proporcionar una primera población de células que pueden soportar el crecimiento de dicho virus y que se han modificado para proporcionar (a) el ARNv genómico de dicho virus y (b) una nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN, mediante lo cual se forman los complejos de RNP que contienen dichos ARNv genómicos y se ensamblan dichas partículas virales infecciosas, expresándose directamente dichos ARNv genómicos en dichas células bajo el control del promotor Pol I de mamífero o un derivado funcional del mismo en ausencia de un virus cooperador, y
>
> en el que dichas células no producen interferón.

Se apreciará que las células huésped modificadas para el rescate viral, tal como se describió anteriormente, constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Las partículas virales producidas por dicha primera población de células pueden amplificarse mediante una o más etapas de infección celular adicionales, por ejemplo, empleando células cultivadas iguales o diferentes de dicha primera población de células. Para su uso, las partículas virales así producidas pueden aislarse.

Cuando las partículas virales inicialmente producidas por las células huésped no se atenúan, puede llevarse a cabo posteriormente una etapa de atenuación o inactivación viral convencional, por ejemplo, antes de la formulación para su uso como vacuna. Las partículas virales generadas según la invención pueden ser partículas virales recombinantes que pueden expresar una secuencia heteróloga. Tales partículas, si fuese necesario tras la atenuación o inactivación según sea apropiado, también pueden formularse para su uso como vacuna u otro fin terapéutico.

A diferencia de las técnicas de rescate basadas en virus cooperador anteriores para el virus influenza, los métodos de la invención pueden usarse fácilmente para la generación de virus influenza infecciosos de cualquiera de los tipos A, B y C con múltiples mutaciones en varios genes diferentes al mismo tiempo. Un método de este tipo también permite una producción más sencilla y más directa de un virus segmentado de polaridad negativa reasortante que contiene segmentos de ARNv derivados de más de un virus original. Convencionalmente, se obtienen virus reasortantes mediante la selección de partículas virales de una infección viral mixta de células. Un método de la invención es particularmente ventajoso para la producción de un virus segmentado de polaridad negativa reasortante que es difícil de aislar mediante métodos clásicos.

Breve descripción de la figura

La figura 1 es una representación esquemática de una realización de la invención, tal como se describe adicionalmente en los ejemplos 1 a 3, en los que se cotransfectan 12 plásmidos para la expresión directa de los segmentos de ARNv de un virus influenza A y la expresión de subunidades de ARN polimerasa dependiente de ARN y nucleoproteína de influenza A en células Vero cultivadas (células de riñón de mono verde africano). En esta realización, se emplean células MDBK (de riñón bovino Madin-Darby) para un ensayo de placas de lisis y la amplificación de partículas virales rescatadas. Sin embargo, se apreciará que pueden emplearse igualmente otras células que soportan el crecimiento del virus influenza A para el ensayo de placas de lisis y para la amplificación incluyendo células Vero y MDCK (riñón canino Madin-Darby). En la figura 1, POL I = promotor de ARN polimerasa I humano trucado, R= ribozima genómica del virus de la hepatitis, MLP= promotor tardío principal de adenovirus tipo 2 unido a una secuencia sintética que comprende la secuencia líder tripartita de corte y empalme del adenovirus humano tipo 2 y pA= secuencia de poliadenilación de SV40.

Descripción detallada de la invención

Se prefiere emplear vectores de expresión para expresar directamente segmentos genómicos de ARNv del virus deseado. Estos pueden ser segmentos de ARNv totalmente de tipo natural o pueden incluir al menos un segmento de ARNv de tipo no natural, por ejemplo, un segmento de ARNv mutante con una o más sustituciones, inserciones o deleciones de nucleótidos.

Por ejemplo, al menos un segmento de ARNv proporcionado en las células huésped puede ser un segmento de ARNv quimérico que puede expresar una secuencia heteróloga al genoma viral en células diana infectadas por el virus rescatado. Dicha secuencia heteróloga, puede codificar para un péptido o un polipéptido. Alternativamente, puede codificar para un ácido nucleico tal como una ribozima o un ácido nucleico antisentido. La secuencia heteróloga puede proporcionarse en un segmento de ARNv que adicionalmente codifica para una proteína viral nativa completa tal como se ilustra mediante el segmento de ARNv quimérico descrito en el ejemplo 8 o puede insertarse en la secuencia codificante para una proteína viral. Por ejemplo, se sabe que la proteína HA del virus influenza A puede tolerar un injerto de epítopos en el sitio antigénico B. Se revisan métodos para construir tales segmentos de ARNv quiméricos, por ejemplo en, Muster y García-Sastre, Cap. 9, Textbook of Influenza (1998) y Palese *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 11354-11358. También se han descrito previamente estrategias para construir segmentos de ARNv de virus influenza quiméricos en la solicitud de patente internacional publicada WO 91/03552.

Los segmentos de ARNv proporcionados en las células huésped pueden incorporar adicional o alternativamente una o más mutaciones atenuantes. Por ejemplo, los segmentos de ARNv pueden ser los segmentos de ARNv de un virus influenza A con una sustitución de par de bases atenuante en una región promotora dúplex "pan-handle" (estructura con forma de mango de sartén), en particular, por ejemplo, la sustitución de par de bases atenuante conocida de A por C y U por G en la posición 11-12' en la región dúplex del ARNv específico de NA (Fodor *et al*., J. Virol. (1998) 6238-6290). Usando el sistema de rescate de la invención, pueden identificarse nuevas mutaciones atenuantes. Tal como se indica anteriormente, cuando las partículas virales no atenuadas se producen inicialmente mediante un método de la invención, la atenuación o inactivación de las partículas virales puede, sin embargo, lograrse secuencialmente, mediante métodos clásicos.

Los virus atenuados o inactivados producidos según la invención pueden incorporarse posteriormente a la composición de vacuna de una manera convencional. Cuando tal virus tiene un segmento de ARNv quimérico, tal como se trató anteriormente, que codifica para un antígeno foráneo, puede formularse para lograr la vacunación frente a más de un patógeno simultáneamente. Los virus recombinantes atenuados producidos según la invención, que tienen un segmento de ARNv quimérico también pueden diseñarse para otros usos terapéuticos, por ejemplo un agente antitumoral o una herramienta para terapia génica, en cuyo caso la producción de virus vendrá seguida de su incorporación en una composición farmacéutica apropiada junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

También, tal como se indicó anteriormente, el rescate sin virus cooperador según la invención está particularmente favorecido para la generación de virus reasortantes, especialmente virus influenza reasortantes deseados para su uso

como vacuna. Por ejemplo, por medio de un rescate viral según la invención, los segmentos de ARNv de NA y HA de un virus influenza, por ejemplo, influenza A/PR8/34 que se reconoce como adecuado para la administración a seres humanos, pueden sustituirse fácilmente por los segmentos de ARNv de NA y HA de una cepa de virus influenza asociada con una infección epidémica de gripe. Tales virus influenza reasortantes pueden, por ejemplo, usarse para la producción de una vacuna de virus influenza inactivo de la manera convencional (véanse los ejemplos 4 y 6).

Los vectores de expresión empleados pueden ser preferiblemente plásmidos que pueden dar la replicación en las células huésped elegidas. Puede proporcionarse un vector de expresión diferente para la expresión directa de cada segmento de ARNv requerido o el ARNc correspondiente. Tal como ya se ha mencionado anteriormente, puede proporcionarse un segundo conjunto de vectores de expresión para cada una de las subunidades de ARN polimerasa dependiente de ARN y la nucleoproteína, por ejemplo, las subunidades PB1, PB2 y PA de una ARN polimerasa dependiente de ARN de un virus influenza. Sin embargo, tal como se indicó también anteriormente, puede usarse alternativamente una línea celular que puede expresar una o más de estas proteínas, en cuyo caso puede reducirse o incluso eliminarse el segundo conjunto de vectores de expresión. El ejemplo 7 ilustra un método de este tipo para el rescate sin virus cooperador de un virus influenza A empleando una línea celular que expresa de manera estable la nucleoproteína.

Todos los vectores de expresión necesarios pueden introducirse preferiblemente en la célula huésped elegida en una única etapa de cotransfección o cotransducción. Con este fin, puede emplearse preferiblemente la transfección liposomal, por ejemplo usando el reactivo de transfección liposomal DOTAP (Boehinger Mannheim) o LipofectAMINE 2000 (Gibco BRL).

Sin embargo, se apreciará que puede llevarse a cabo más de una etapa de transferencia de vector, y otros medios conocidos para la introducción de vectores en las células de mamíferos empleadas, por ejemplo, electroporación, transfección con DEAE-dextrano, bombardeo de micropartículas y transducción viral, por ejemplo, el uso de retrovirus defectuosos en la replicación. También se prefiere particularmente la precipitación con fosfato de calcio (véase el ejemplo 5). Puede elegirse, por ejemplo para introducir en las células huésped vectores de expresión para la expresión de las proteínas NP y polimerasa antes de los vectores de expresión para la expresión de los segmentos de ARNv. Las células huésped en la que los vectores requeridos se introducen puede estar en una placa de cultivo o cultivados de otras formas apropiadas para la transfección o transducción de vectores.

La expresión de los segmentos de ARNv o los correspondientes ARNc estará preferiblemente bajo el control de una secuencia promotora derivada de un promotor Pol I de ARN de mamífero. Particularmente preferido para este fin es el promotor Pol I de ARN humano truncado que consiste en los nucleótidos -250 a -1 del promotor nativo correspondiente o un derivado funcional del mismo (Jones *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. (1998) 85, 669-673). Sin embargo, alternativamente pueden usarse otros promotores, incluyendo, por ejemplo, un promotor de ARN polimerasa T7. Para garantizar el extremo 3' correcto de cada ARNv o ARNc expresado, cada vector de expresión de ARNv o ARNc incorporará una secuencia de ribozima o la secuencia de terminación apropiada en sentido 3' de la secuencia codificante de ARN. Esto puede ser, por ejemplo, la secuencia de ribozima genómica del virus de la hepatitis delta o un derivado funcional de la misma. Alternativamente, por ejemplo, puede emplearse un terminador Pol I (Neumann *et al*., Virology (1994) 202, 477-479). Los vectores de expresión de ARN pueden construirse de la misma manera que los vectores de expresión de ARNv descritos en Pleschka *et al*., J. Virol. (1996) 70, 4188-4192.

Cuando se necesitan uno o más vectores de expresión de proteínas para expresar proteínas virales para la formación de complejos de RNP, éstos expresarán preferiblemente las proteína(s) viral(es) requerida(s) homóloga(s) al virus deseado. La expresión de las subunidades de la polimerasa dependiente de ARN y la nucleoproteína puede estar preferiblemente, por ejemplo, bajo el control de una secuencia reguladora que comprende el promotor tardío principal del adenovirus 2 unido a la secuencia líder tripartita de corte y empalme de adenovirus humano tipo 2, tal como se describe por Berg *et al*., BioTechniques, 14, 972-978, o un derivado funcional de dicha secuencia reguladora. Sin embargo, pueden sustituirse posiblemente secuencias de promotor alternativas operativas en células de mamíferos tales como, por ejemplo, otro promotor viral tal como, por ejemplo, el promotor precoz de citomegalovirus (CMV) humano o un promotor de polimerasa T7. Plásmidos apropiados para la expresión de subunidades de polimerasa y NP pueden construirse, por ejemplo, partiendo del plásmido pGT-h tal como también se describe en el artículo anteriormente citado de Berg *et al*.

La descripción se describirá adicionalmente a continuación con referencia específica al rescate de virus influenza A. Con el fin del rescate del virus influenza A mediante la estrategia de la invención utilizando plásmidos que expresan directamente los ARNv requeridos, ha resultado favorable, por ejemplo, usar células Vero (riñón de mono verde africano), aunque pueden emplearse otras células que soportan el crecimiento de virus influenza, por ejemplo, preferiblemente células de riñón embrionario humano 293T. Tales células pueden transfectarse preferiblemente sobre la superficie de una placa de cultivo adecuada.

Se sabe las células Vero son deficientes en la expresión de interferón (Diaz *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85, 5259-5263), que puede ser un factor para alcanzar un buen rescate viral. Por tanto, se extrapola que las células Vero y otras células deficientes en la actividad o respuesta de interferón que soportarán el crecimiento de virus ARN segmentados de polaridad negativa son útiles en la práctica de la invención.

Pueden determinarse cantidades y razones apropiadas de vectores para llevar a cabo un método de la invención mediante experimentación rutinaria. Como guía, en el caso de transfección liposomal o precipitación con calcio de plásmidos en células huésped, se prevé que cada plásmido puede emplearse con unos cuantos μg, por ejemplo de 1 a 10 μg, por ejemplo diluido hasta una concentración final de ADN total de aproximadamente 0,1 μg/ml antes de mezclarlo con el reactivo de transfección de la manera convencional. Puede preferirse usar vectores que expresan subunidades de ARN polimerasa dependiente de ARN y/o NP a una concentración superior que aquellos que expresan segmentos de ARNv.

Según ciertos aspectos, la presente memoria descriptiva también proporciona un método para generar en células cultivadas partículas virales infecciosas de un virus ARN sementado de polaridad negativa, método que comprende:

(i) proporcionar una población de células que pueden soportar el crecimiento de dicho virus y que se modifican de modo que puedan proporcionar (a) los ARNv genómicos de dicho virus en ausencia de un virus cooperador y (b) una nucleoproteína y ARN polimerasa dependiente de ARN mediante lo cual pueden formarse el complejo o complejos de RNP que contienen dichos ARNv genómicos y pueden ensamblarse dichas partículas virales, expresándose directamente dichos ARN genómicos en dichas células bajo el control de un promotor Pol I de mamífero o un derivado funcional del mismo, por ejemplo, el promotor Pol I humano truncado tal como se indicó anteriormente y

(ii) cultivar dichas células, mediante lo cual se producen dichas partículas virales.

Dichas células productoras de virus pueden, por ejemplo, ser preferiblemente células Vero u otras células deficientes en actividad o respuesta de interferón que soportarán el crecimiento de un virus ARN segmentado de polaridad negativa. Pueden proporcionarse todas o algunas de las secuencias codificantes para dichos ARNv genómicos, nucleoproteína y ARN polimerasa dependiente de ARN, en las células huésped elegidas introduciendo vectores de expresión en las células.

Los siguientes ejemplos muestran la invención con referencia al rescate sin virus cooperador de un virus influenza A. Sin embargo tal como se indicó anteriormente, la invención no está limitada a dichos virus sino que puede aplicarse a otros virus ARN segmentados de polaridad negativa, especialmente, por ejemplo virus influenza de otros tipos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de plásmidos que codifican para los segmentos de ARNv de un virus influenza A

Se usaron ocho plásmidos cada uno expresando un segmento de ARNv diferente del virus influenza A/WSN/33 (pPOL1-PB2-RT, pPOL1-PB1-RT, pPOL1-PA-RT, pPOL1-HA-RT, pPOL1-NP-RT, pPOL1-NA-RT, pPOL1-M-RT y pPOL1-NS-RT). Éstos eran plásmidos basados en pUC19 o pUC18 análogos en estructura al plásmido que codifica para el segmento de ARNv modelo, pPOL-CAT-RT, descrito en Pleschka *et al*., (1996) J. Virol., 70, 4183-4192, aparte de la sustitución del ADNc que codifica para el segmento del gen indicador CAT del ARNv (un marco de lectura abierto para cloranfenicol acetiltransferasa en polaridad negativa flanqueado por las regiones no codificantes del segmento de ARNv que codifica para NS del virus influenza A/WSN/33) mediante un ADNc que codifica para un segmento de ARNv nativo del virus influenza A/WSN/33. En cada uno de estos plásmidos, un promotor Pol I de ARN humano truncado (posiciones -250 a -1) se fusionó con el extremo del ADNc que codifica para un segmento de ARNv para garantizar el extremo 5' correcto del ARNv transcrito. También se proporciona en cada uno de los plásmidos que codifican para un segmento de ARNv, la secuencia de la ribozima genómica del virus de la hepatitis delta para garantizar también el extremo 3' correcto del ARNv transcrito.

Pueden obtenerse muestras del virus influenza A/WSN/33 para la preparación de los insertos de ADNc de los plásmidos descritos anteriormente, por ejemplo, a partir de W.H.O. Collaborating Centre, Division of Virology, National Institute for Medical Research (Centro colaborador de la OMS, División de Virología, Instituto Nacional para la Investigación Médica), Londres, R.U.).

Ejemplo 2

Preparación de plásmidos para la expresión de proteínas PB1, PB2, PA y NP del virus influenza A/WSN/33.

Adicionalmente, se prepararon 4 plásmidos de expresión (pGT-h-PB1, pGT-h-PB2, pGT-h-PA y p-GT-h-NP) que pueden expresar cada uno una proteína distinta seleccionada de las proteínas PB1, PB2, PA y NP requeridas bajo el control del promotor tardío principal de adenovirus 2 unido a la secuencia sintética que comprende la secuencia líder tripartita de corte y empalme del adenovirus humano tipo 2. Se notificó anteriormente que este promotor daba una expresión de alto nivel de proteínas en células adaptadas para el cultivo en suspensión sin suero (Berg *et al*., (1993) BioTechniques, 14, 972-978). El conjunto de pGT-h de plásmidos de expresión de proteínas se construyó insertando los marcos de lectura abiertos para las proteínas PB1, PB2, PA y NP en el sitio de clonación Bcl I del plásmido pGT-h (Berg *et al*. (1993) *ibíd*.).

Los plásmidos de expresión que codifican para la nucleoproteína viral y 3 subunidades de proteína de la ARN polimerasa dependiente de ARN se cotransfectaron en células 293 humanas o células Vero con el plásmido de expresión pPOL1-CAT-RT. Tanto en las células 293 humanas como Vero transfectadas, pudo detectarse actividad CAT. Se eligieron células Vero para la generación sin virus cooperador del virus influenza A/WSN/33 a partir de segmentos de ARNv transfectados tal como se describe adicionalmente más adelante dado que soportan un mejor crecimiento del virus influenza A/WSN/33 que las células 293 humanas (aproximadamente una diferencia de un log en el título viral máximo).

Ejemplo 3

Rescate sin virus cooperador del virus influenza A/WSN/33

Para el rescate viral, se cotransfectaron células Vero casi confluentes en placas de 8,5 cm de diámetro (aproximadamente 10^7 células que cubren aproximadamente el 90% de la placa) con los cuatro plásmidos de expresión de proteínas y los ocho plásmidos de transcripción de ARNv descritos anteriormente. Para esta etapa de cotransfección, se diluyeron 5 μg de cada uno de los plásmidos de expresión de proteína polimerasa, 10 μg del plásmido de expresión de NP y 3 μg de cada uno de los 8 plásmidos que codifican para ARNv hasta una concentración de 0,1 μg/μl en tampón Hepes 20 mM (pH 7,5). La disolución de ADN se añadió al reactivo de transfección liposomal DOTAP diluido (Boehringer Mannheim) que contiene 240 μl de DOTAP y 720 μl de tampón Hepes 20 mM (pH 7,5). Se incubó la mezcla de transfección a temperatura ambiente durante 15 min. y entonces se mezcló con 6,5 ml de medio esencial mínimo (MEM) que contiene un 0,5% de suero de ternero fetal (FCS), un 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA), penicilina y estreptomicina. Se añadió esta mezcla a las células Vero lavadas con PBS. Se eliminó el medio de transfección después de 24 horas de las células y se sustituyó con 8 ml de medio fresco (MEM) que contenía un 0,5% de FCS, un 0,3% de BSA, penicilina y estreptomicina. Las células Vero transfectadas se cultivaron durante al menos 4 días tras la transfección. Cada día, se recogía el medio de las células transfectadas y se analizaba para determinar la presencia de virus influenza mediante un cultivo de placas de lisis de una alícuota de 0,5 ml sobre células MDBK de la manera convencional. El resto del medio se transfirió a matraces de 75 cm^2 de células subconfluentes para la amplificación de cualquier virus rescatado. Las células transfectadas originales se incubaron adicionalmente después de añadir 8 ml de medio nuevo.

Este procedimiento dio como resultado la recuperación del virus influenza infeccioso en el día 4 tras la transfección. Se obtuvieron aproximadamente de 10 a 20 partículas virales formadoras de placas de lisis de una placa de 8,5 cm que contiene aproximadamente 10^7 células. El virus rescatado mostró una propiedad específica característica del virus influenza A/WSN/33, es decir, formó placas de lisis sobre las células MDBK en ausencia de tripsina. Las placas de lisis formadas por el virus rescatado son comparables en tamaño con aquellas formadas mediante la muestra de virus A/WSN/33 auténtico de control que se hizo crecer sobre las mismas células MDBK.

Para confirmar que las placas de lisis virales observadas sobre las células MDBK tratadas con virus recogido del medio de cultivo de células transfectadas se derivaban de los ADNc clonados, se introdujeron etiquetas genéticas en dos de los 8 ADNc de segmento de ARNv. Se construyó un ADNc que codifica para un segmento de ARNv HA con una mutación de 6 nucleótidos cerca del extremo 3' del segmento. Los nucleótidos 31 a 35 del extremo 3' (3'-UUUUG-5') se sustituyeron por 3'-AAAAC-5' dando como resultado una sustitución de aminoácido en el aminoácido 4(K → F) y en el aminoácido 5(L → V) cerca del extremo N-terminal de HA dentro del péptido señal. Además, se creó una mutación silenciosa C → U en el nucleótido 40. Estos cambios introdujeron varios sitios de restricción nuevos, incluyendo un sitio SpeI único. El ADNc que codifica para el segmento NA se mutó para codificar para un segmento NA que contiene dos mutaciones silenciosas en los nucleótidos 1358 y 1360 de modo que se introduzca un sitio de restricción SacI único nuevo (Pleschka *et al*., J. Virol. (1996) 70, 4188-4192).

Se usó medio de células MDBK infectadas con el virus transfectante rescatado para aislar ARNv. Se trataron 100 μl de medio con 5 u de ADNasa sin ARNasa para eliminar cualquier ADN de plásmido residual remanente. Después de 15 min. a 37ºC, se aisló ARNv usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Se amplificaron regiones cortas de los ARNv de HA y NA que se esperaba que contuviesen las etiquetas genéticas mediante RT-PCR y después se analizaron mediante digestión con las enzimas de restricción SpeI y SacI, respectivamente. Como control, también se amplificaron las mismas regiones de los segmentos HA y NA a partir del ARNv aislado del virus influenza A/WSN/33 auténtico usando los mismos cebadores de la RT-PCR.

Los productos de la PCR obtenidos a partir del virus rescatado y del virus de control eran del mismo tamaño. Aquellos que provenían de los segmentos HA y NA del virus rescatado pudieron digerirse con SpeI y SacI respectivamente. Sin embargo, los productos de la PCR correspondientes al virus de control, tal como se esperaba, no se digirieron por las mismas enzimas. La omisión de la transcriptasa inversa en las reacciones de RT-PCR de control no dio como resultado productos de la PCR visibles.

Comentarios

Los estudios descritos anteriormente muestran que es posible rescatar un virus influenza A mediante cotransfección de 8 plásmidos de transcripción para los segmentos ARNv individuales y 4 plásmidos de expresión que codifican para las proteínas NP, PB1, PB2 y PA requeridas en células Vero en ausencia de cualquier virus cooperador.

Se destaca que en los estudios mencionados anteriormente, el virus influenza se generó expresando segmentos de ARNv de sentido negativo. Esto parece contradecir algunos estudios anteriores que enfatizan la importancia de usar ARN de polaridad positiva para rescatar virus ARN de polaridad negativa, incluyendo virus *Bunyamwera* cuyo genoma está en 3 segmentos (Schnell *et al*., (1994) EMBO J., 13, 4195-4203; Roberts y Rose (1998), Virology 247, 1-6; Bridgen y Elliot (1996) 93, 15400-15404). Sin embargo, se han notificado recuperaciones exitosas más recientes de virus ARN no segmentados de polaridad negativa a partir de ARN de sentido negativo (Kato *et al*., (1996) Genes Cells 1, 569-579; Durbin *et al*. (1997) Virology, 235, 323-332).

En un protocolo de la invención, tal como se ilustró anteriormente, en las fases iniciales tras la transfección, coexiste ARNm de sentido positivo procedente de los 4 plásmidos de expresión de proteínas con ARNv genómico desnudo de sentido negativo transcrito a partir de los plásmidos de transcripción. Por tanto, puede formarse ARN de doble cadena. La formación de tal ARN de doble cadena en células humanas podría conducir posiblemente a la inducción de respuestas antivirales mediadas por interferón y consecuentemente a la supresión del crecimiento de cualquier virus rescatado. Sin embargo, tal inducción de interferón se obvia como un problema en las células Vero dado que tales células son deficientes en la expresión de interferón.

Ejemplo 4

Rescate sin virus cooperador de virus influenza A/PR/8/34 (variante Cambridge)

Con el fin de rescatar A/PR/8/34 completamente de ADN recombinante, se generaron 12 plásmidos. Los 12 plásmidos son análogos a los descritos para el rescate del virus A/WSN/33 (véanse los ejemplos 1 y 2 anteriormente), con unas cuantas modificaciones. Los 8 plásmidos requeridos para la síntesis de los 8 segmentos de ARNv, mediante ARN polimerasa 1 celular, tienen una secuencia de terminación de ADNr murino (Gen-Bank, número de registro M12074) en lugar del ribozima del virus de la hepatitis delta para generar el extremo 3' exacto de los segmentos de ARNv. Los 4 plásmidos de expresión de proteínas para las subunidades de polimerasa de A/PR/8/34 (PB1, PB1, PA) y la nucleoproteína (NP) se basan en el pcDNA3 disponible comercialmente (Invitrogen, nº de catálogo V790-20), que tiene un promotor de citomegalovirus (CMV) y un sitio de poli(A) de la hormona de crecimiento bovina (HCB).

Construcción del plásmido pPolISapIT

Con el fin de permitir la fácil clonación de los 8 segmentos de ARNv, se construyó un nuevo vector de clonación básico, pPolISapIT. En este nuevo constructo, la secuencia de terminación de ADNr murino (posiciones +572 a +715) se sitúa en sentido 3' del promotor Pol I. El promotor Pol I y las secuencias de terminación están separadas por una secuencia de ligador de 24 pb (5'-AGAAGAGCCAGATCTGGCTCTTCC-3'), que contiene sitios de restricción SapI.

Se derivó el plásmido pPolISapIT de pPolICAT- RT (descrito originalmente en Pleschka *et al*., J. Virol. 70, 4188-4192, 1996). Se insertó un fragmento de ADN que contiene una región de la secuencia de terminación de ADNr murino (posiciones +335 a +715, número de registro de GenBank M12074) en el sitio SalI de pPolI-CAT-RT para generar pPolI-CAT-T. Posteriormente, usando una técnica de PCR inversa, se eliminaron el gen CAT, la ribozima y parte de la secuencia de terminación de ADNr murino (posiciones +335 a +571) de pPolI-CAT-T. Al mismo tiempo, se introdujo la secuencia de ligador de 24 pb dada anteriormente a través de los cebadores de PCR entre el promotor Pol I y la secuencia de terminación de ADNr murino.

Construcción de los vectores de expresión de ARNv

Se generó ADNc mediante RT-PCR a partir de ARNv aislado del virus influenza A/PR/8/34 (variante Cambridge) usando los cebadores de PCR con proyecciones SapI. Tras la digestión con SapI, se clonaron los productos de la PCR en pPolISapIT digerido con SapI.

Rescate viral

La cotransfección de los 12 plásmidos en células Vero usando el reactivo de transfección DOTAP y siguiendo el protocolo facilitado en el ejemplo 3 (véase también Fodor *et al*., J. Virol. (noviembre de 1999) 73, 9679-9682) dio como resultado el rescate de partículas infecciosas del virus influenza A/PR/8/34 en el día 4 tras la transfección. Los ensayos de placas de lisis y la amplificación viral se realizaron sobre células MDCK en presencia de tripsina 0,5 μg/ml.

Comentarios

Estos resultados demuestran que el virus influenza A/PR8/34 puede rescatarse satisfactoriamente mediante el método sin virus cooperador de la invención. Esto es de particular interés puesto que se sabe que el virus influenza A/PR8/34 es avirulento para los seres humanos (Beare *et al*. (1975) Trials in man with live recombinants made from A/PR8/34 (HON1) and wild H3 N2 influenza viruses, Lancet (ii) 729-732) mientras que el virus influenza A/WSN/33 no se considera adecuado para la administración a seres humanos por su conocido neurotropismo en ratones. Así, se propone que el virus influenza A/PR8/34, en una forma atenuada de manera adecuada, sería adecuado como virus original para el desarrollo de una vacuna viva. Por ejemplo, el rescate viral sin virus cooperador según la invención podría usarse para generar un virus reasortante atenuado partiendo de vectores de expresión para los ARNv del vi-

rus influenza A/PR8/34 aparte de la sustitución de los segmentos genómicos HA y NA del virus A/PR8/34 por los segmentos genómicos HA y NA de una cepa de virus influenza asociada con una infección epidémica de gripe. A continuación, en el ejemplo 6 se facilitan ejemplos adicionales del uso del rescate viral sin virus cooperador según la invención para generar virus influenza reasortantes.

Ejemplo 5

Protocolos mejorados para el rescate sin virus cooperador de virus influenza A/WSN/33

Los 4 plásmidos de expresión de proteínas especificados en el ejemplo 2 se sustituyeron por los plásmidos de expresión de proteínas especificados en el ejemplo 4 derivados de pcDNA3. Usando estos cuatro plásmidos de expresión de proteínas junto con los ocho plásmidos de transcripción de ARNv especificados en el ejemplo 1 (véase también Fodor *et al*., J. Virol. (1999) 73, 9679-9682) en los 3 protocolos expuestos a continuación, se obtuvieron entre 100-10.000 partículas virales formadoras de placas de lisis a partir de 10^6 células en el día 2 tras la transfección. Esto es al menos 100 veces más virus que el obtenido mediante los estudios de transfección notificados en el ejemplo 3.

Protocolo (a)

Transfección de células 293T usando el reactivo de transfección "LipofectAMINE 2000"

Se combinaron 1 μg de cada uno de los 12 plásmidos y se ajustó el volumen a 50 μl añadiendo medio OPTIMEM (Gibco BRL). En un tubo de poliestireno, se combinaron 12 μl de LipofectAMINE 2000 (Gibco BRL, nº de cat. 11 668-027) y 238 μl de medio OPTIMEM y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadió gota a gota la mezcla de ADN al reactivo de transfección LipofectAMINE 2000 diluido. Tras incubar la mezcla de ADN-Lipofectamine a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos, se añadió gota a gota la mezcla a una suspensión de células 293T (aproximadamente 10^6 células en 1 ml de DMEM que contiene un 10% de FCS sin antibióticos). Aproximadamente a las 16-24 horas tras la transfección, se retiró la mezcla de transfección y se sustituyó por 1 ml de DMEM que contiene un 0,5% de FCS, un 0,3% de BSA, penicilina y estreptomicina. 24-48 horas después, se seleccionó el virus rescatado mediante cultivo de placas de lisis de 100 μl del medio de las células 293 T transfectadas sobre células MDBK y haciendo pasar el resto del medio sobre un matraz de MDBK semiconfluentes de 25 cm^2. Se añadió 1 ml de DMEM que contiene un 0,5% de FCS, un 0,3% de BSA, penicilina y estreptomicina a las células 293T transfectadas y se continuó la incubación durante otros de 2 a 3 días antes de repetir el cultivo de placas de lisis y la amplificación sobre células MDBK.

Protocolo (b)

Transfección de células 293T usando precipitación con fosfato de calcio

Para la transfección usando precipitación con fosfato de calcio, se combinaron 1 μg de cada uno de los 12 plásmidos y se añadió la mezcla del plásmido a 250 μl de tampón 2x HEBS (Hepes 40 mM, NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 2 mM, glucosa 10 mM, pH 7,05). Luego se añadieron 250 μl de $CaCl_2$ 250 mM y se mezcló vigorosamente el contenido del tubo. Tras 20-30 min. a temperatura ambiente, se mezcló el precipitado con 1 ml de DMEM que contiene un 10% de FCS, penicilina y estreptomicina y se añadió a una suspensión de células 293T (aproximadamente 10^6 células en 1 ml de DMEM que contiene un 10% de FCS sin antibióticos). Aproximadamente a las 16-24 horas tras la transfección, se retiró la mezcla de transfección y se sustituyó por 1 ml de DMEM que contiene un 0,5% de FCS, un 0,3% de BSA, penicilina y estreptomicina. 24-48 horas después, se seleccionó el virus rescatado como en el protocolo (a) anterior.

Protocolo (c)

Transfección de células Vero usando reactivo de transfección DOTAP

Se combinaron 1 μg de cada uno de los 12 plásmidos y se ajustó el volumen a 120 μl añadiendo Hepes 20 mM (pH 7,5) para dar una concentración de ADN de aproximadamente 0,1 μg/μl. Entonces, se añadió la disolución de ADN a reactivo de transfección DOTAP diluido (Boehringer) que contiene 60 μl de DOTAP y 200 μl de Hepes 20 mM (pH 7,5) en un tubo de poliestireno. Tras la incubación de la mezcla de ADN-DOTAP a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-20 minutos, se añadió gota a gota la mezcla en una suspensión de células Vero (aproximadamente 10^6 células en 1 ml de MEM que contiene un 10% de FCS, penicilina y estreptomicina). Aproximadamente a las 16-24 horas tras la transfección, se retiró la mezcla de transfección y se sustituyó por 1 ml de MEM que contiene un 0,5% de FCS, un 0,3% de BSA, penicilina, y estreptomicina. 24-48 horas después, se seleccionó el virus rescatado mediante cultivo de placas de lisis de 100 μl del medio de las células Vero transfectadas sobre células MDBK y haciendo pasar el resto del medio sobre un matraz de MDBK semiconfluentes de 25 cm^2. Se añadió 1 ml de MEM que contiene un 0,5% de FCS, un 0,3% de BSA, penicilina y estreptomicina a las células Vero transfectadas y se continuó la incubación durante otros de 2 a 3 días antes de repetir el cultivo de placas de lisis y la amplificación sobre células MDBK.

Ejemplo 6

Rescate sin virus cooperador de virus influenza reasortante

Se ha usado satisfactoriamente el rescate basado en plásmidos según la invención para generar virus influenza reasortantes. Se generaron los siguientes virus reasortantes:

(i) A/WSN/33 con el segmento PA derivado de A/PR/8/34

(ii) A/WSN/33 con el segmento NP derivado de A/PR/8/34

(iii) A/WSN/33 con el segmento M derivado de A/PR/8/34

(iv) A/WSN/33 con el segmento PB2 derivado de A/FPV/Dobson/34

Estos ejemplos demuestran la utilidad del método sin virus cooperador para aislar virus reasortantes. Se requieren virus reasortantes basados en A/PR8/34 (u otras cepas adecuadas) para la producción de vacunas inactivadas convencionales porque crecen hasta alto título en óvulos de gallina fecundados, usados en la producción comercial de vacunas inactivadas de gripe. Tal como se indicó previamente en lo anterior, se observa así que una importante aplicación del rescate viral sin virus cooperador según la invención es que es un aislamiento más sencillo y más directo de virus reasortantes que mediante el método clásico de aislamiento de virus reasortantes a partir de una infección mixta de células con dos virus vivos. De manera importante, usando un método de la invención, se obvia la necesidad de seleccionar muchos posibles virus reasortantes antes de que se aísle el requerido.

Ejemplo 7

Rescate sin virus cooperador de virus influenza A/WSN/33 sobre células EcR-293

Se ha conseguido el rescate del virus influenza A/WSN/33 sobre células EcR-293NP, una línea celular que expresa de manera estable el virus influenza NP, transfectando 11 plásmidos.

Las células EcR-293NP se derivan de la línea celular disponible comercialmente EcR-293 (Invitrogen, nº de catálogo R650-07) que expresa de manera constitutiva las subunidades VgEcR y RXR del receptor de la ecdisona. La expresión del virus influenza NP en tales células puede inducirse en respuesta a ponasterona A. Se usó el mismo protocolo que el especificado en el ejemplo 5(a) empleando el reactivo de transfección LipofectAMINE 2000 excepto en que se omitió pcDNA-NP, puesto que la proteína NP para la encapsidación inicial de los segmentos de ARNv la proporcionaron las células EcR-293NP.

Ejemplo 8

Rescate sin virus cooperador de un virus influenza recombinante que expresa un antígeno foráneo

Se generó el plásmido pPOL1-E6N18-2A-NA que puede expresar un segmento de ARNv quimérico basado en el segmento de ARNv NA del virus influenza A/WSN/33. Se insertó la secuencia codificante de ARNv modificada entre secuencias correspondientes a un promotor Pol I humano truncado y a un ribozima del virus de la hepatitis delta como para la preparación de los plásmidos de expresión Pol I descritos en el ejemplo 1. El gen quimérico resultante contenía un marco de lectura abierto largo (ORF) que codifica para los primeros 88 aminoácidos de la proteína E6 de papilomavirus humano 18 (VPH 18), seguido por 17 aminoácidos correspondientes al motivo de autoescisión de la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (VFA), seguido por la secuencia de aminoácidos del NA del virus influenza A/WSN/33. La región codificante estaba flanqueada por las regiones no codificantes del gen NA del virus A/WSN/33. De esta manera, se generó un gen del virus influenza quimérico que codifica para una poliproteína que experimenta autoescisión, dando como resultado la generación de un polipéptido derivado de VPH y la proteína NA. Previamente se ha descrito una estrategia similar para la expresión de antígenos foráneos mediante vectores de virus influenza generados mediante la transfección con RNP clásica (T. Muster y A. Garcia-Sastre, Genetic manipulation of influenza viruses, en Textbook of Influenza, K.G. Nicholson, R.G. Webster & A.J. Hay, eds., págs. 93-106 (1998), Blackwell Science Ltd, Oxford, RU.)

Se generó el vector del virus influenza recombinante que expresa el antígeno derivado de VPH18 mediante la cotransfección en células 293T de pPOL1-E6N18-2A-NA junto con 7 vectores de expresión de PolI que codifican para los ARN virales de tipo natural, es decir, PB2, PB1, PA, HA, NP, M y NS según se describe en el ejemplo 1 y los 4 vectores de expresión de PolII que codifican para las proteínas PB2, PB1, PA y NP según se describe en el ejemplo 5. El virus rescatado tiene la secuencia de nucleótidos correcta confirmada mediante el análisis de secuencia de su ARN viral específico de NA.

REIVINDICACIONES

1. Método para generar partículas virales infecciosas de un virus ARN segmentado de polaridad negativa que tiene más de 3 segmentos genómicos de ARNv, comprendiendo dicho método:

introducir en células cultivadas vectores de expresión que expresan en dichas células los segmentos genómicos de ARNv completo de dicho virus, o los correspondientes ARNc completos de dicho virus, en el que dichas células soportan el crecimiento de dicho virus, proporcionando también dichas células una nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN mediante lo cual se forman los complejos de RNP que contienen los segmentos genómicos de ARNv de dicho virus y se producen dichas partículas virales infecciosas por dichas células en ausencia de un virus cooperador y en el que dichas células no producen interferón.

2. Método según la reivindicación 1, en el que se emplean uno o más vectores de expresión adicionales en dichas células para expresar una o más proteínas seleccionadas de dicha nucleoproteína y las subunidades de dicha ARN polimerasa dependiente de ARN.

3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se emplea una línea celular que puede expresar una o más de dicha nucleoproteína y las subunidades de dicha ARN polimerasa dependiente de ARN.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho virus es un virus influenza de tipo A, B o C.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho virus es un virus reasortante que tiene segmentos de ARNv derivados de más de un virus original.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas células son células Vero.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos vectores de expresión definidos en la reivindicación 1 expresan segmentos genómicos de ARNv de dicho virus.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además amplificar dichas partículas virales formadas mediante una o más etapas de infección celular posteriores empleando el mismo o diferente tipo de células.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además aislar partículas virales infecciosas.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además una etapa de inactivación o atenuación viral.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que todos los vectores de expresión requeridos se cotransfectan en dichas células usando un reactivo de transfección liposomal, precipitación con fosfato de calcio o electroporación.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dichos vectores de expresión son todos plásmidos.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dichos vectores de expresión definidos en la reivindicación 1 consisten en vectores de expresión diferentes para la expresión de cada segmento de ARNv de dicho virus o los correspondientes ARNc.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la expresión de cada segmento de ARNv o ARNc está bajo el control de una secuencia promotora derivada de un promotor Pol I de mamífero.

15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha secuencia promotora es una secuencia promotora Pol I humana truncada que consiste en los nucleótidos -250 a -1 del correspondiente promotor nativo o un derivado funcional del mismo.

16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la secuencia codificante para cada segmento de ARNv o ARNc en dichos vectores de expresión está seguida por una secuencia de ribozima o terminador de la transcripción que produce un extremo 3' correcto de cada uno de dichos ARN.

17. Método según la reivindicación 2, en el que la expresión de una o más proteínas virales a partir de dichos vectores de expresión adicionales está bajo el control de una secuencia reguladora seleccionada del promotor de expresión tardía principal de adenovirus 2 unido a la secuencia líder tripartita de corte y empalme del adenovirus

humano de tipo 2 o el promotor de expresión precoz de citomegalovirus humano, o un derivado funcional de dicha secuencia reguladora.

18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende además incorporar un virus atenuado o inactivado en una composición de vacuna.

19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho virus tiene al menos un segmento de ARNv que puede dirigir la expresión de una secuencia heteróloga a dicho virus en células diana infectadas por dicho virus.

20. Método según la reivindicación 19, en el que dicha secuencia heteróloga a dicho virus codifica para un péptido antigénico o polipéptido antigénico y que comprende además incorporar dicho virus en una composición de vacuna.

21. Células modificadas según se producen en la reivindicación 1 o la reivindicación 6.

22. Método de producción de partículas virales infecciosas de un virus segmentado de polaridad negativa que comprende cultivar células modificadas según la reivindicación 21.

23. Método para generar en células cultivadas partículas virales infecciosas de un virus segmentado de polaridad negativa, comprendiendo dicho método:

proporcionar una primera población de células que pueden soportar el crecimiento de dicho virus y que se han modificado para proporciona (a) los ARNv genómicos de dicho virus y (b) una nucleoproteína y ARN polimerasa dependiente de ARN mediante lo cual se forman complejos de RNP que contienen dichos ARNv genómicos y se ensamblan dichas partículas virales infecciosas, expresándose directamente dichos ARNv genómicos en dichas células bajo el control de un promotor Pol I de mamífero o un derivado funcional del mismo en ausencia de un virus cooperador, y

en el que dichas células no producen interferón.

24. Método según la reivindicación 22, que comprende además amplificar dichas partículas virales ensambladas mediante una o más etapas de infección celular posteriores empleando el mismo o diferente tipo de células.

25. Método según la reivindicación 23 o la reivindicación 24, que comprende además aislar partículas virales infecciosas.

26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, que comprende además una etapa de atenuación o de inactivación viral.

27. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, que comprende además incorporar partículas virales atenuadas o inactivadas en una composición de vacuna.

28. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que dicho virus tiene al menos un segmento de ARNv que puede dirigir la expresión de una secuencia heteróloga a dicho virus en células diana infectadas por dicho virus y que comprende además incorporar dicho virus, si es apropiado tras la atenuación o inactivación, en una composición farmacéutica junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que dichas células son células Vero.

30. Células modificadas según se producen en la reivindicación 23 o la reivindicación 29.

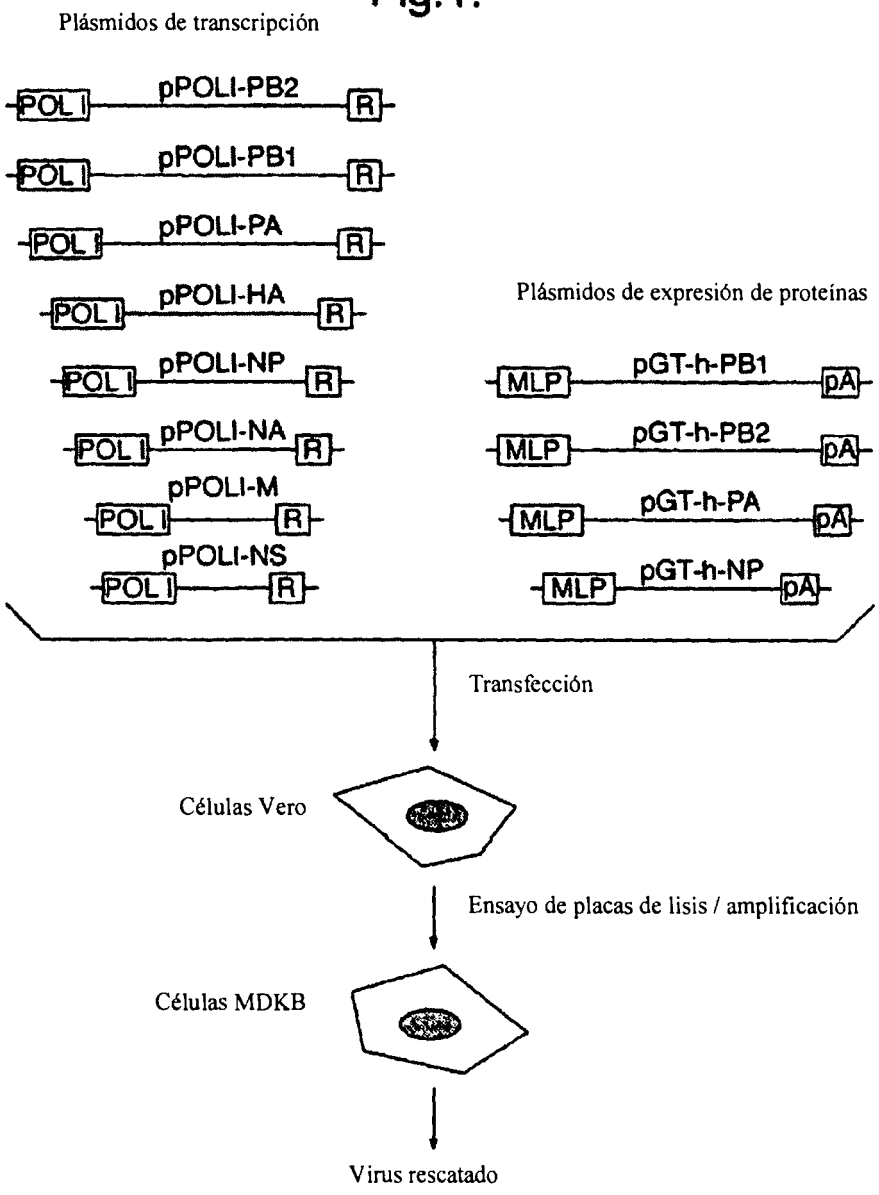
31. Método de producción de partículas virales infecciosas de un virus segmentado de polaridad negativa que comprende cultivar células modificadas según la reivindicación 30.

32. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 y 18 a 20, en el que las células usadas para la amplificación son células MDBK o células MDCK.

33. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, en el que las células usadas para la amplificación son células MDBK o células MDCK.

34. Método según las reivindicaciones 1 a 20, 22 a 29 o 31 a 33, en el que las células son células EcR-293NP.

Fig.1.


Plásmidos de transcripción
POL I
pPOLI-PB2
R
pPOLI-PB1
pPOLI-PA
pPOLI-HA
pPOLI-NP
pPOLI-NA
pPOLI-M
pPOLI-NS
Plásmidos de expresión de proteínas
MLP
pGT-h-PB1
pA
pGT-h-PB2
pGT-h-PA
pGT-h-NP
Transfección
Células Vero
Ensayo de placas de lisis / amplificación
Células MDKB
Virus rescatado