



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 177**

51 Int. Cl.:  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99927443 .4**  
86 Fecha de presentación : **11.06.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1086207**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2001**

54 Título: **Nuevos métodos y sustratos deficientes en interferón para la propagación de virus.**

30 Prioridad: **12.06.1998 US 89103 P**  
**18.11.1998 US 108832 P**  
**29.01.1999 US 117683 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **Mount Sinai School of Medicine of the  
City University of New York**  
**One Gustave L. Levy Place**  
**New York, New York 10029-6574, US**

72 Inventor/es: **Palese, Peter;**  
**García-Sastre, Adolfo y**  
**O'Neil, Robert**

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro**

ES 2 281 177 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevos métodos y sustratos deficientes en interferón para la propagación de virus.

5 La invención se refiere a la producción de vacunas de virus de la gripe atenuado, teniendo los virus modificaciones del gen NS1 que disminuyen o eliminan la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar la respuesta a IFN celular, con la condición de que dichos virus no son virus de la gripe C. Los virus mutantes replican *in vivo*, pero demuestran patogenicidad reducida, y por lo tanto son muy adecuados para su uso en vacunas de virus vivos, y formulaciones farmacéuticas.

## 10 2. Antecedentes de la invención

### 2.1 *El virus de la gripe*

15 Las familias de virus que contienen ARN de cadena sencilla envuelto, del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y Virus de la Enfermedad de Borna) o los que tienen genomas segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*). La familia de *Orthomyxoviridae*, descrita con detalle a continuación, y usada en los ejemplos en este documento, incluye los virus de la gripe, tipos A, B y C, así como virus Thogoto y Dhori y virus de la anemia de salmón infecciosos.

20 Los viriones de la gripe están constituidos por un núcleo de ribonucleoproteína interna (una nucleocápsida helicoidal) que contiene el genoma de ARN de cadena sencilla, y una envuelta de lipoproteína externa forrada en el interior por una matriz proteica (M1). El genoma segmentado del virus de la gripe A está constituido por ocho moléculas (siete para gripe C) de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa, lineales que codifican diez polipéptidos, incluyendo: 25 las proteínas de ARN polimerasa dependiente de ARN (PB2, PB1 y PA) y nucleoproteínas (NP) que forman la nucleocápsida; las proteínas de membrana de la matriz (M1, M2); dos glicoproteínas de superficie que se proyectan a partir de la envuelta que contiene lípidos: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP). La transcripción y la replicación del genoma tiene lugar en el núcleo y el ensamblaje se produce mediante gemación de la membrana plasmática. Los virus pueden reordenar genes durante las 30 infecciones mezcladas.

El virus de la gripe se adsorbe mediante HA a sialiloligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular. Después de la endocitosis del virión, se produce un cambio conformacional en la molécula de HA dentro del 35 endosoma celular que facilita la fusión de la membrana, desencadenando de este modo el desrecubrimiento. La nucleocápsida migra hacia el núcleo donde se transcribe el ARNm viral. El ARNm viral se transcribe mediante un único mecanismo en el que la endonucleasa viral escinde el extremo 5' con capucha de los ARNm heterólogos celulares, que sirven después como cebadores para la transcripción de plantillas de ARN viral por la transcriptasa viral. Los transcritos terminan en sitios de 15 a 22 bases de los extremos de sus plantillas, donde las secuencias oligo(U) actúan como señales para la adición de tramos de poli(A). De las ocho moléculas de ARN viral producidas de este modo, 40 seis son mensajes monocistrónicos que se traducen directamente en las proteínas que representan HA, NA, NP y las proteínas de polimerasa viral, PB2, PB1 y PA. Los otros dos transcritos experimentan corte y empalme del ADN, produciendo cada uno dos ARNm que se traducen en diferentes fases de lectura para producir M1, M2, NS1 y NEP. En otras palabras, los ocho segmentos de ARN viral codifican diez proteínas: nueve estructurales y una no estructural. Un resumen de los genes del virus de la gripe y sus productos proteicos se muestra en la Tabla 1.

45 TABLA 1

### 50 SEGMENTOS DE ARN DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA GRIPE Y ASIGNACIONES DE CODIFICACIÓN<sup>a</sup>

55 Segmento	Longitud <sub>b</sub> (Nucleótidos)	Polipéptido <sub>c</sub> Codificado	Longitud <sub>d</sub> (Aminoácidos)	Moléculas Por Virión	Comentarios
1	2341	PB2	759	30-60	60 Componente transcriptasa de ARN; unión a la capucha de ARN de la célula 65 hospedadora

ES 2 281 177 T3

5	2	2341	PB1	757	30-60	Componente transcriptasa de ARN; Iniciación de la transcripción del ARN
10	3	2233	PA	716	30-60	Componente transcriptasa de ARN
15	4	1778	HA	566	500	Hemaglutinina; trímero; glicoproteína de la envuelta; media la unión a las células
20	5	1565	NP	498	1000	Nucleoproteína; asociada con ARN; componente estructural de transcriptasa de ARN
25	6	1413	NA	454	100	Neuranimidasa; tetrámero; glicoproteína de la envuelta de la matriz proteica;
30	7	1027	M <sub>1</sub>	252	3000	Reviste el interior de la envuelta
35			M <sub>2</sub>	96	?	Proteína estructural en la membrana plasmática; ARNm cortado y empalmado
40						
45						
50						
55						
60						
65						

## ES 2 281 177 T3

5	8	890	NS <sub>1</sub>	230		Proteína no estructural, función desconocida
10			NEP	121	?	Proteína de exportación nuclear; ARNm cortado y empalmado

---

<sup>a</sup> Adaptado de R.A. Lamb y P. W. Choppm (1983), *Annual Review of Biochemistry*, Volumen 52, 467-506.

<sup>b</sup> Para la cepa A/PR/8/34

<sup>c</sup> Determinado mediante enfoques bioquímico y genético

<sup>d</sup> Determinado mediante análisis de la secuencia de nucleótidos y secuenciación de proteínas

---

El genoma del virus de la gripe A contiene ocho segmentos de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa, que codifican una proteína no estructural y nueve estructurales. La proteína no estructural NS1 es abundante en células infectadas con virus de la gripe, pero no se ha detectado en viriones. NS1 es una fosfoproteína descubierta en el núcleo en las etapas tempranas durante la infección y también en el citoplasma en los últimos momentos del ciclo viral (King *et al.*, 1975, *Virology* 64: 378). Los estudios con mutantes de la gripe sensibles a la temperatura (ts) que llevan lesiones en el gen NS sugirieron que la proteína NS1 es un regulador transcripcional y post-transcripcional de los mecanismos por los cuales el virus es capaz de inhibir la expresión génica de la célula hospedadora y de estimular la síntesis de proteínas virales. Como muchas otras proteínas que regulan procesos post-transcripcionales, la proteína NS1 interacciona con secuencias y estructuras de ARN específicas. Se ha informado de que la proteína NS1 se une a diferentes especies de ARN incluyendo: ARNv, poli-A, ARNsn U6, región 5' no traducida como la de ARNm virales y ARNdc (Qiu *et al.*, 1995, *ARN* 1: 304; Qiu *et al.*, 1994, *J. Virol.* 68: 2425; Hatada Fukuda 1992, *J Gen Virol.* 73: 3325-9. La expresión de la proteína NS1 a partir de ADNc en células transfectadas se ha asociado con varios efectos: inhibición de transporte núcleo-citoplásmico de ARNm, inhibición del corte y empalme previo de ARNm, inhibición de la poliadenilación de ARNm del hospedador y estimulación de la traducción de ARNm viral (Fortes, *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13: 704; Enami, *et al.*, 1994, *J. Virol.* 68: 1432; de la Luna, *et al.*, 1995, *J. Virol.* 69: 2427; Lu, *et al.*, 1994, *Genes Dev.* 8: 1817; Park, *et al.*, 1995, *J. Biol Chem.* 270, 28433; Nemeroff *et al.*, 1998, *Mol. Cell.* 1: 991; Chen, *et al.*, 1994 *EMBO J.* 18: 2273-83).

### 2.2 Virus atenuados

Las vacunas de virus inactivados se preparan "matando" el patógeno viral, por ejemplo, mediante tratamiento con calor o formalina, de modo que no sea capaz de replicarse. Las vacunas inactivadas tienen utilidad limitada puesto que no proporcionan inmunidad a largo plazo y, por lo tanto, producen una protección limitada. Un enfoque alternativo para producir vacunas de virus implica el uso de vacunas de virus vivos atenuados. Los virus atenuados son capaces de replicarse pero no son patogénicos, y, por lo tanto proporcionan una inmunidad a más largo plazo y producen una mayor protección. Sin embargo, los métodos convencionales para producir virus atenuados implican la posibilidad de aislamiento de mutantes en el intervalo de hospedadores, muchos de los cuales son sensibles a temperatura; por ejemplo, el virus se pasa a través de hospedadores no naturales, y se seleccionan virus de la progenie que son inmunogénicos, aunque ya no patogénicos.

Un sustrato convencional para aislar y cultivar virus de la gripe para fines de vacuna son huevos de gallina embrionados. Los virus de la gripe se cultivan típicamente durante 2-4 días a 37°C en huevos de 10-11 días de edad. Aunque la mayoría de los aislados primarios humanos de virus de la gripe A y B crecen mejor en el saco amniótico de los embriones, después de 2 a 3 pasajes los virus se vuelven adaptados al crecimiento en las células de la cavidad alantoica, que es accesible desde el exterior del huevo (Murphy, B.R., y R.G. Webster, 1996. *Orthomyxoviruses* p. 1397-1445. En *Fields Virology*. Lippincott-Raven P.A.)

La tecnología de ADN recombinante y las técnicas de manipulación genética, en teoría, producirían un enfoque superior para producir un virus atenuado puesto que pueden introducirse de forma deliberada mutaciones específicas en el genoma viral. Sin embargo, las alteraciones genéticas requeridas para la atenuación de virus no se conocen o no son predecibles. En general, los intentos de usar tecnología de ADN recombinante para producir vacunas virales se

han dirigido principalmente hacia la producción de vacunas de subunidad que contienen solamente las subunidades de proteína del patógeno implicado en la respuesta inmune, expresadas en vectores virales recombinantes tales como virus vaccinia o baculovirus. Más recientemente, se han utilizado técnicas de ADN recombinante en un intento de producir mutantes de delección de herpesvirus o poliovirus que imitan virus atenuados encontrados en la naturaleza o mutantes del intervalo de hospedadores conocidos. Hasta 1990, los virus de ARN de cadena negativa no eran en absoluto susceptibles a la manipulación específica de sitio, y por lo tanto no podían manipularse genéticamente.

Los virus de la gripe vivos atenuados producidos de este modo pueden no ser capaces de suprimir la respuesta a interferón en el hospedador en el que se replican. Por lo tanto, aunque estos virus son beneficiosos porque son inmunogénicos y no patogénicos, son difíciles de propagar en sustratos convencionales para los fines de preparar vacunas.

Además, los virus atenuados pueden poseer características de virulencia que son tan leves que no permiten que el hospedador monte una respuesta inmune suficiente para satisfacer estimulaciones posteriores.

El documento WO 97/08292 describe un método para la producción potenciada de virus atenuados en cultivo celular, proporcionando cultivos celulares animales en los que la expresión de genes de interferón disminuye desde el nivel normal de expresión. El documento WO 97/08292 describe el uso de cultivos celulares en los que el nivel de actividad proteica antiviral mediada por interferón, particularmente por la quinasa dependiente de ARN doble cadena (PKR) y 2'-5' oligoadenilato sintetasa se reducen significativamente.

Egorov *et al.* (1998, J. Virol. 72 (8): 6437-41) describen el cultivo eficaz de virus de la gripe A con largas delecciones en la proteína NS1 en células Vero en contraste con células MDCK. Especulan que este comportamiento en cultivo diferencial podría deberse al hecho de que las células Vero son deficientes en la expresión de interferón funcional.

### 3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la producción de vacunas de virus de la gripe atenuados teniendo los virus una mutación en el gen NS1 que disminuye o elimina la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar la respuesta a IFN celular, con la condición de que dichos virus no sean virus de la gripe C.

Los virus mutantes con una actividad antagonista de IFN alterada son atenuados, son infecciosos, pueden replicarse *in vivo* para proporcionar niveles de infección subclínicos, y no son patogénicos. Por lo tanto, son candidatos ideales para vacunas de virus vivos. Además, los virus atenuados pueden inducir una respuesta a IFN robusta que tiene otras consecuencias biológicas *in vivo*, produciendo protección contra posteriores enfermedades infecciosas y/o induciendo respuestas antitumorales. Por lo tanto, los virus atenuados pueden usarse farmacéuticamente para la prevención o tratamiento de otras enfermedades infecciosas, cáncer en individuos de alto riesgo, y/o enfermedades tratables con IFN. Los virus usados en la invención pueden seleccionarse entre cepas de origen natural, variantes o mutantes; virus mutagenizados (por ejemplo, generados mediante exposición a mutágenos, pasajes repetidos y/o pasajes en hospedadores no permisivos); reordenantes (en el caso de genomas virales segmentados); y/o virus manipulados genéticamente (*por ejemplo*, usando las técnicas de "genética inverna") que tienen el fenotipo deseado, es decir, una capacidad alterada de antagonizar la respuesta celular a IFN. Los virus mutantes o manipulados genéticamente pueden seleccionarse en base al crecimiento diferencial en sistemas deficientes en IFN frente a sistemas competentes en IFN. Por ejemplo, pueden seleccionarse los virus que crecen en un sistema deficiente en IFN, pero no en un sistema competente en IFN (o que crecen menos bien en un sistema competente en IFN).

Los virus atenuados seleccionados de este modo pueden usarse ellos mismos como el ingrediente activo en vacunas o formulaciones farmacéuticas. Como alternativa, los virus atenuados pueden usarse como el vector o "estructura" de vacunas producidas de forma recombinante. Con este fin, puede usarse la técnica "genética inversa" para producir mutaciones o introducir epítomos extraños en el virus atenuado, que podrían servir como la cepa "parental". De esta manera, pueden diseñarse vacunas para inmunización contra variantes de cepas, o como alternativa, contra agentes infecciosos completamente diferentes o antígenos de enfermedad. Por ejemplo, el virus atenuado puede manipularse para expresar epítomos neutralizantes de otras cepas preseleccionadas. Como alternativa, pueden construirse epítomos de virus diferentes de los virus de ARN de cadena negativa en el virus mutante atenuado (*por ejemplo*, gp 160, gp 120 o gp 41 de VIH). Como alternativa, pueden introducirse en el virus epítomos de patógenos infecciosos no virales (*por ejemplo*, parásitos, bacterias, hongos). En otra alternativa más, pueden prepararse vacunas del cáncer, *por ejemplo*, introduciendo antígenos tumorales en la estructura viral atenuada.

En una realización particular que implica virus de la gripe, con la condición de que dichos virus no sean virus de la gripe C, pueden usarse técnicas de reordenación para transferir el fenotipo atenuado desde una cepa de virus parental (un mutante natural, un virus mutagenizado, o un virus manipulado genéticamente) a una cepa de virus diferente (un virus de tipo silvestre, un mutante natural, un virus mutagenizado, o un virus manipulado genéticamente).

Los virus atenuados, que inducen respuestas a IFN robustas en hospedadores, también pueden usarse en formulaciones farmacéuticas para la profilaxis o tratamiento de otras infecciones víricas, o enfermedades tratables con IFN, tales como cáncer. A este respecto, el tropismo de los virus atenuados puede alterarse para dirigir el virus a un órgano, tejido o células diana deseadas *in vivo* o *ex vivo*. Usando este enfoque, la respuesta a IFN puede inducirse de forma local, en el sitio diana, evitando o minimizando de este modo los efectos secundarios de tratamientos con IFN sistémi-

co. Con este fin, el virus atenuado puede manipularse para expresar un ligando específico para un receptor del órgano, tejido, o células diana.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de que el NS1 del virus de la gripe de tipo silvestre funciona como un antagonista de IFN, en el sentido de que NS1 inhibe la respuesta mediada por IFN de células hospedadoras infectadas con el virus. Se descubrió que los mutantes virales deficientes para actividad NS1, eran potentes inductores de la respuesta a IFN celular, y demostraron un fenotipo atenuado *in vivo*, es decir, los virus mutantes se replican *in vivo*, pero tienen efectos patogénicos reducidos. Sin pretender limitarse a ninguna teoría o explicación para la que los inventores trabajan, las características atenuadas de los virus de la invención se deben presumiblemente a su capacidad para inducir una respuesta a IFN celular robusta, y su capacidad alterada para antagonizar la respuesta a IFN del hospedador. Sin embargo, las características beneficiosas de los virus atenuados de la invención pueden no ser solamente atribuibles a los efectos de la respuesta a interferón celular. De hecho, las alteraciones de otras actividades asociadas con NS1 pueden contribuir al fenotipo atenuado deseado.

Los virus de la gripe mutantes con actividad antagonista de IFN alterada demostraron replicar *in vivo* generando títulos que son suficientes para inducir respuestas inmunológicas y respuestas a citoquina. Por ejemplo, la vacunación con virus de la gripe atenuados redujo el título viral en animales que se estimulaban posteriormente con virus de la gripe de tipo silvestre. Los virus de la gripe atenuados también demostraron actividad antiviral y antitumoral. La preinfección con virus de la gripe atenuado inhibió la replicación de otras cepas de virus de la gripe de tipo silvestre, y otros virus (tales como virus Sendai) superinfectados en huevos embrionados. La inoculación de la gripe atenuada en animales inyectados con células tumorales, redujo la cantidad de focos formados. Puesto que se sabe que el virus de la gripe induce una respuesta CTL (linfocito T citotóxico), el virus atenuado es un candidato muy atractivo para vacunas del cáncer.

Para formulaciones de vacuna, se prefieren las mutaciones que disminuyen pero no suprimen la actividad antagonista a IFN del virus, dichos virus pueden seleccionarse para el cultivo en sustratos convencionales y no convencionales, y para virulencia intermedia. En particular, los solicitantes han demostrado que un mutante de truncamiento C-terminal de NS1 se replica a títulos altos en sustratos deficientes en IFN, tales como huevos de gallina embrionados de 6 y 7 días de edad, así como en la membrana alantoica de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad, el sustrato convencional para virus de la gripe que no permite el crecimiento de mutantes de virus de la gripe en los que todo el gen NS1 se deleta (también denominados en este documento mutantes “knockout”). Sin embargo, la replicación del mutante de truncamiento C-terminal de NS1 disminuye en huevos embrionados de 12 días de edad. Este enfoque permite, por primera vez, la generación e identificación de virus de ARN de cadena negativa atenuados vivos que tienen alterada, pero no suprimida, la actividad antagonista de IFN, y que son capaces de crecer en sustratos adecuados para la preparación de vacunas. Este enfoque también permite por primera vez, un eficaz sistema de identificación y selección para gripe u otros virus que contienen mutaciones que confieren actividad antagonista de interferón alterada, pero no suprimida.

La invención también se refiere al uso de sistemas deficientes en IFN para propagar los virus atenuados que no pueden cultivarse en sistemas convencionales usados actualmente para la producción de vacunas. La expresión “sistemas deficientes en IFN” como se usa en este documento, se refiere a huevos embrionados inmaduros de seis a nueve días de edad o a una línea celular deficiente en interferón, con la condición de que dicha línea celular no sean células Vero y no sea líneas celulares STAT (-), que no producen IFN o producen niveles bajos de IFN, no responden o responden menos eficazmente a IFN, y/o son deficientes en la actividad de genes antivirales inducidos por IFN. Dichos huevos embrionados o líneas celulares pueden pretratarse con compuestos que inhiben el sistema de IFN (incluyendo fármacos, anticuerpos, antisentido, ribozimas, etc.).

La invención también se refiere a métodos para propagar virus en los sistemas deficientes en IFN de la invención. En una realización, un método para propagar virus comprende (a) cultivar el virus en huevos embrionados inmaduros de seis a nueve días de edad; y (b) recoger virus de la progenie, con la condición de que dicho virus no sea virus de la gripe C. En otra realización, un método para propagar virus comprende (a) cultivar el virus en una línea celular deficiente en interferón; y (b) recoger virus de la progenie, con la condición de que dicho virus no sea virus de la gripe C y la línea celular deficiente en interferón no sea células Vero y no sean líneas celulares STAT (-).

#### 4. Descripción de las figuras

Fig. 1. El virus delNS1 inhibe la replicación del virus de la gripe A de tipo silvestre en huevos. Se inocularon huevos de gallina embrionados de diez días de edad con el pfu indicado del virus delNS1. Ocho horas después, los huevos se infectaron con  $10^3$  pfu de virus WSN. Después de dos días de incubación a 37°C, se recogió el líquido alantoico y se determinaron los títulos del virus WSN mediante ensayo en placas en células MDBK. Los resultados son la media de dos huevos.

Fig. 2. Inducción de una respuesta antiviral en huevos embrionados mediante virus delNS1. Se inocularon huevos de gallina embrionados de diez días de edad con PBS (sin tratar) o con  $2 \times 10^4$  pfu de virus delNS1 (tratados con delNS1). Ocho horas después, los huevos se infectaron en ese momento con  $10^3$  pfu de virus de la gripe A/WSN/33 (H1N1), virus de la gripe A/PR8/34 (H+N1), virus de la gripe A/X-31 (H3N2), virus de la gripe B/Lee/40, o virus Sendai. Después de dos días de incubación, el líquido alantoico se recogió y los títulos del virus se determinaron mediante un ensayo de hemaglutinación. Los resultados son la media de dos huevos.

Fig. 3. Se transfectaron células CV1 con un plásmido que expresaba IRF-3 fusionado con la proteína verde fluorescente (GFP). Esto permitió determinar la situación de IRF-3 dentro de las células mediante microscopía de fluorescencia. En algunos casos, se co-transfectó un plásmido de expresión de NS1 con el plásmido de expresión de IRF-3 a las proporciones indicadas. 24 horas después de la transfección, las células se infectaron a alta moi (multiplicidad de infección) con virus PR8(WT) o con virus delNS1 según fuera indicado. 10 horas después de la infección, se analizaron las células en un microscopio de fluorescencia para detectar la situación de IRF-3-GFP. Se indican los porcentajes de células que mostraban situación citoplasmática exclusiva (CIT) y situaciones citoplasmática y nuclear de IRF-3 (Nuc+Cit).

## 5. Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a la producción de vacunas de virus de la gripe atenuados, teniendo los virus una mutación en el gen NS1 que disminuye o elimina la capacidad de los productos del gen NS1 para antagonizar la respuesta a IFN celular, con la condición de que dichos virus no sean virus de la gripe C.

Los virus pueden seleccionarse entre cepas de origen natural, variantes o mutantes; virus mutagenizados (*por ejemplo*, mediante exposición a irradiación UV, mutágenos y/o pases en medio de cultivo); reordenantes; y/o virus manipulados genéticamente. Por ejemplo, los virus mutantes pueden generarse mediante variación natural, exposición a irradiación UV, exposición a mutágenos químicos, mediante pasaje en hospedadores no permisivos, mediante reordenación (*es decir*, mediante co-infección de un virus atenuado con otra cepa que tiene los antígenos deseados), y/o mediante manipulación genética (*por ejemplo*, usando “genética inversa”). Los virus seleccionados para su uso en la invención tienen actividad antagonista de IFN defectuosa y están atenuados; *es decir*, son infecciosos y pueden replicarse *in vivo*, pero generan solamente títulos bajos dando como resultado niveles de infección subclínicos que no son patogénicos. Dichos virus atenuados son candidatos ideales para vacunas vivas.

Los virus atenuados seleccionados para su uso en la invención deben ser capaces de inducir una respuesta a IFN robusta en el hospedador, una característica que contribuye a la generación de una respuesta inmune fuerte cuando se usan como vacuna, y que tiene otras consecuencias biológicas que hacen útiles a los virus como agentes farmacéuticos para la prevención y/o tratamiento de las infecciones víricas, o formación de tumores en individuos de alto riesgo, u otras enfermedades que se tratan con IFN.

La invención se basa, en parte, en varios descubrimientos y observaciones realizados por los solicitantes cuando trabajaban con mutantes de virus de la gripe. En primer lugar, la respuesta a IFN es importante para contener la infección viral *in vivo*. Los Solicitantes descubrieron que el cultivo de virus de la gripe A/WSN/33 de tipo silvestre en ratones deficientes en IFN (ratones STAT1 *-/-*) dio como resultado una infección pan-orgánica; *es decir*, la infección viral no estaba limitada a los pulmones como lo estaba en ratones de tipo silvestre que generan una respuesta a IFN (García-Sastre, *et al.*, 1998, J. Virol. 72: 8550). En segundo lugar, los solicitantes establecieron que el NS1 del virus de la gripe funciona como un antagonista de IFN. Los solicitantes descubrieron que un mutante del virus de la gripe con todo el gen NS1 deleciónado (*es decir* un “knockout” para NS1) no era capaz de crecer a títulos altos en las células hospedadoras competentes en IFN, y sólo podía propagarse en hospedadores deficientes en IFN. El virus knockout para NS1 demostró un fenotipo atenuado (*es decir*, era letal en ratones STAT1 *-/-* deficientes en IFN, pero no en ratones de tipo silvestre) y se descubrió que era un inductor potente de respuestas a IFN en células hospedadoras. (García-Sastre, *et al.*, 1998, Virology 252: 324-330.). La preinfección con el virus mutante knockout para NS1 redujo los títulos de virus de la gripe de tipo silvestre y otros virus (*por ejemplo*, Sendai) superinfectados en huevos embrionados. En otro experimento, la infección con el virus de la gripe mutante knockout para NS1 redujo la formación de focos en animales inoculados con células tumorales. Por tanto, el virus de la gripe knockout para NS1 demostró propiedades biológicas interesantes. Sin embargo, los virus mutantes knockout para NS1 no pudieron propagarse en sistemas convencionales para la producción de vacunas. Para superar este problema, los solicitantes usaron y desarrollaron sistemas deficientes en IFN que permiten la producción de rendimientos razonables de virus atenuado.

Además, los solicitantes diseñaron mutantes de deleción de NS1, que no delecionaban todo el gen. Curiosamente, se descubrió que estos mutantes de NS1 mostraban un fenotipo “intermedio”, el virus puede cultivarse en hospedadores convencionales usados para propagar virus de la gripe (aunque el cultivo es mejor en el sistema deficiente en IFN que produce títulos más altos). Lo más importante, los mutantes de deleción eran atenuados *in vivo*, e inducen una respuesta a IFN robusta. La vacunación con los mutantes truncados para NS1 del virus de la gripe dio como resultado títulos bajos de virus en animales estimulados posteriormente con virus de tipo silvestre, y produjo protección contra la enfermedad.

La presente invención también se refiere a los sustratos diseñados para el aislamiento, identificación y cultivo de virus para fines de vacuna. En particular, se describen sustratos deficientes en interferón para cultivar de forma eficaz mutantes del virus de la gripe. De acuerdo con la presente invención, un sustrato deficiente en interferón es uno que es deficiente en su capacidad para producir o responder al interferón.

Los virus atenuados pueden usarse como vacunas contra un amplio intervalo de virus y/o antígenos, incluyendo aunque sin limitación antígenos de variantes de cepas, virus diferentes u otros patógenos infecciosos (*por ejemplo*, bacterias, parásitos, hongos), o antígenos tumorales específicos. Los virus atenuados, que inhiben la replicación viral y la formación tumoral, pueden usarse para la profilaxis o tratamiento de infección (patógenos virales o no virales) o la formación tumoral o el tratamiento de enfermedades para las cuales IFN es de beneficio terapéutico. Pueden

usarse muchos métodos para introducir las formulaciones de virus atenuados vivos a un sujeto humano o animal para inducir una respuesta inmune o a citoquinas apropiada. Estos incluyen, aunque sin limitación, vías intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. Los virus atenuados de la presente invención podrían formularse para suministro por vía intranasal.

### 5.1 Generación de mutantes con actividad antagonista de IFN alterada

Pueden seleccionarse mutantes o variantes del virus de la gripe de origen natural, o mutantes espontáneos que tengan una capacidad alterada para antagonizar la respuesta a IFN celular. Pueden generarse virus de la gripe mutantes exponiendo el virus a mutágenos, tales como irradiación ultravioleta o mutágenos químicos, o mediante pasajes múltiples y/o pasaje en hospedadores no permisivos. Puede usarse la selección en un sistema de cultivo diferencial para seleccionar los mutantes que tengan una función antagonista de IFN alterada. El fenotipo atenuado puede transferirse a otra cepa que tenga un antígeno deseado mediante reordenación (*es decir*, mediante coinfección del virus atenuado y la cepa deseada, y la selección de reordenantes que muestren ambos fenotipos).

Pueden introducirse mutaciones en un virus de la gripe, usando enfoques de “genética inversa”. De esta manera, pueden introducirse mutaciones naturales o de otro tipo que confieren el fenotipo atenuado a las cepas de vacuna. Por ejemplo, pueden introducirse deleciones, inserciones o sustituciones de la región codificante del gen responsable de la actividad antagonista de IFN (el NS1 de la gripe). También se contemplan deleciones, sustituciones o inserciones en la región no codificante del gen responsable de la actividad antagonista de IFN. Con este fin, pueden introducirse mutaciones en las señales responsables de la transcripción, replicación, poliadenilación y/o presentación del gen responsable de la actividad antagonista de IFN. Por ejemplo, en virus de la gripe, dichas modificaciones pueden incluir aunque sin limitación: sustitución de las regiones no codificantes de un gen del virus de la gripe A por las regiones no codificantes de un gen del virus de la gripe B (Muster, *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5177), intercambios de pares de bases en las regiones no codificantes de un gen del virus de la gripe (Fodor, *et al.*, 1998, J Virol. 72: 6283), mutaciones en la región promotora de un gen del virus de la gripe (Piccone, *et al.*, 1993, Virus Res. 28: 99; Li, *et al.*, 1992, J Virol. 66: 4331), sustituciones y deleciones en el tramo de restos de uridina en el extremo 5' de un gen de un virus de la gripe que afecta a la poliadenilación (Luo, *et al.*, 1991, J Virol. 65: 2861; Li, *et al.*, J Virol. 1994, 68: 1245). Dichas mutaciones, por ejemplo en el promotor, pueden regular negativamente la expresión del gen responsable de la actividad antagonista de IFN. Las mutaciones en genes virales que pueden regular la expresión del gen responsable de la actividad antagonista de IFN también están dentro del alcance de virus que pueden usarse de acuerdo con la invención.

La técnica genética inversa implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del ARN del virus que son esenciales para el reconocimiento por polimerasas virales y para presentar señales necesarias para generar un virión maduro. Los ARN recombinantes se sintetizan a partir de una plantilla de ADN recombinante y se reconstituyen *in vitro* con complejo de polimerasa viral purificada para formar ribonucleoproteínas (RNP) recombinantes que pueden usarse para transfectar células. Se consigue una transfección más eficaz si las proteínas de polimerasa viral están presentes durante la transcripción del ARN sintético ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las RNP recombinantes sintéticas pueden rescatarse en partículas de virus infecciosas. Las técnicas anteriores se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.166.057 expedida el 24 de noviembre de 1992; en la Patente de Estados Unidos N° 5.854.037 expedida el 29 de diciembre de 1998; en la Publicación de Patente Europea EP 0702085A1, publicada el 20 de febrero de 1996; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 09/152.845; en las Publicaciones de Patente Internacional PCT WO 97/12032 publicada el 3 de abril de 1997; WO96/34625 publicada el 7 de noviembre de 1996; en la Publicación de Patente Europea EP-A780475; WO 99/02657 publicada el 21 de enero de 1999; WO 98/53078 publicada el 26 de noviembre de 1998; WO 98/02530 publicada el 22 de enero de 1998; WO 99/15672 publicada el 1 de abril de 1999, WO 98/13501 publicada el 2 de abril de 1998; WO 97/06270 publicada el 20 de febrero de 1997 y EPO 780 475A1 publicada el 25 de junio de 1997.

Pueden usarse virus atenuados generados mediante el enfoque de genética inversa en la vacuna y formulaciones farmacéuticas descritas en este documento. También pueden usarse técnicas de genética inversa para introducir mutaciones adicionales a otros genes virales importantes para la producción de vacunas *es decir*, los epítomos de variantes de cepas de vacuna útiles pueden introducirse en el virus atenuado. Como alternativa, pueden introducirse epítomos completamente extraños, incluyendo antígenos obtenidos de otros patógenos virales o no virales, en la cepa atenuada. Por ejemplo, pueden introducirse antígenos de virus no relacionados tales como VIH (gp 160, gp 120, gp 41), antígenos de parásitos (*por ejemplo*, malaria) antígenos bacterianos o de hongos o antígenos tumorales en la cepa atenuada. Como alternativa, pueden introducirse epítomos que alteran el tropismo de los virus *in vivo* en los virus atenuados quiméricos de la invención.

Puede usarse una combinación de técnicas de genética inversa y técnicas reordenantes para diseñar virus atenuados que tengan los epítomos deseados en virus de ARN segmentado. Por ejemplo, un virus atenuado (generado mediante selección natural, mutagénesis o mediante técnicas de genética inversa) y una cepa que lleve el epítomo de vacuna deseado (generado mediante selección natural, mutagénesis o mediante técnicas de genética inversa) pueden coinfectarse en hospedadores que permitan la reordenación de los genomas segmentados. Después pueden seleccionarse los reordenantes que muestren el fenotipo atenuado y el epítomo deseado.

En una realización preferida, la presente invención incluye el uso de virus de la gripe manipulados genéticamente que contienen deleciones y/o truncamientos del producto del gen NS1, con la condición de que dichos virus no sean

virus de la gripe C. Se prefieren particularmente los mutantes de NS1 del virus de la gripe A y B. En un enfoque, se conservan porciones de la región amino terminal del producto del gen NS1 mientras que se delecionan porciones de la región C-terminal del producto del gen de NS1. Las mutaciones específicas deseadas pueden introducirse mediante inserción de ácidos nucleicos, delección, o mutación en el codón apropiado. En particular, las proteínas de NS1 truncadas

5 tienen de 1-60 aminoácidos, 1-70 aminoácidos, 1-80 aminoácidos, 1-90 aminoácidos (el aminoácido N-terminal es 1), y preferiblemente 90 aminoácidos; de 1-100 aminoácidos, y preferiblemente 99 aminoácidos; de 1-110 aminoácidos; de 1-120 aminoácidos; o de 1-130 aminoácidos, y preferiblemente 124 aminoácidos del producto del gen NS1 de tipo silvestre.

10 La presente invención también incluye el uso de cualquier virus de la gripe manipulado genéticamente que no sea virus de la gripe C, en el que el producto del gen NS1 se ha modificado mediante truncamiento o modificación de la proteína NS1 que confiere a los virus mutantes los siguientes fenotipos: la capacidad de los virus para crecer a títulos altos en sustratos no convencionales, tales como huevos de gallina de 6-7 días de edad, o la capacidad de los virus para inducir una respuesta a interferón en el hospedador. Para virus de la gripe A, estos incluyen, aunque sin limitación:

15 virus que tienen truncamientos de NS1.

La presente invención incluye el uso de virus de la gripe mutante A o B mutantes de origen natural, que tienen el fenotipo atenuado, así como cepas de virus de la gripe manipuladas para contener las mutaciones responsables del fenotipo atenuado. Para virus de la gripe A, estos incluyen, aunque sin limitación: virus que tienen un NS1 de

20 124 aminoácidos (Norton *et al.*, 1987, *Virology* 156: 204-213). Para virus de la gripe B, estos incluyen, aunque sin limitación: virus que tienen un mutante de truncamiento de NS1 que comprende 127 aminoácidos obtenido del extremo N (B/201) (Norton *et al.*, 1987, *Virology* 156: 204-213), y virus que tienen un mutante de truncamiento de NS1 que comprende 90 aminoácidos obtenido del extremo N (B/AWBY-234) (Tobita *et al.*, 1990, *Virology* 174: 314-19). La presente invención abarca el uso de mutantes de origen natural análogos a NS1/38, NS1/80, NS1/124 (Egorov, *et al.*,

25 1998, *J. Virol.* 72(8): 6437-41) así como los mutantes de origen natural, A/Turkey/ORE/71, B/201 o B/AWBY-234.

El virus de la gripe atenuado puede manipularse adicionalmente para expresar antígenos de otras cepas de vacuna (por ejemplo usando genética inversa o reordenación). Como alternativa, los virus de la gripe atenuados pueden manipularse usando genética inversa o reordenación con virus manipulados genéticamente, para expresar epítopos

30 completamente extraños, *por ejemplo*, antígenos de otros patógenos infecciosos, antígenos tumorales, o antígenos de fijación de objetivos. Puesto que el segmento de ARN de NS es el más corto entre los ocho ARN virales, es posible que el ARN de NS tolere inserciones más largas de secuencias heterólogas que otros genes virales. Además, el segmento de ARN de NS dirige la síntesis de altos niveles de proteína en células infectadas, lo que sugiere que sería un segmento ideal para inserciones de antígenos extraños. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, puede usarse uno

35 cualquiera de los ocho segmentos de virus de la gripe para la inserción de secuencias heterólogas. Por ejemplo, donde se desea la presentación de antígenos en superficie, pueden usarse segmentos que codifican proteínas estructurales *por ejemplo*, HA o NA.

### 5.2 Sistema de selección basado en la restricción del hospedador

40

Pueden usarse métodos para seleccionar virus de la gripe que tengan el fenotipo deseado, *es decir*, virus que tengan actividad baja o ninguna actividad antagonista de IFN, ya se obtengan de variantes naturales, variantes espontáneas (*es decir*, variantes que se desarrollan durante la propagación del virus), variantes naturales mutagenizadas, virus reordenantes y/o manipulados genéticamente. Dichos virus pueden seleccionarse mejor en ensayos de cultivo diferencial que

45 comparan el crecimiento en sistemas hospedadores deficientes en IFN frente a sistemas hospedadores competentes en IFN. Se seleccionan los virus que demuestran un crecimiento mejor en los sistemas deficientes en IFN frente a sistemas competentes en IFN; preferiblemente, se seleccionan virus que crecen hasta títulos al menos mayores en un log en sistemas deficientes en IFN en comparación con un sistema competente en IFN.

50 Como alternativa, los virus pueden seleccionarse usando sistemas de ensayo de IFN *por ejemplo*, sistemas de ensayo basados en la transcripción en los que la expresión de un gen informador se controla mediante un promotor sensible a IFN. Puede medirse la expresión del gen informador en células infectadas frente a células no infectadas para identificar virus que inducen de forma eficaz una respuesta a IFN, pero que no son capaces de antagonizar la respuesta a IFN.

55

Pueden usarse ensayos de crecimiento diferencial para seleccionar virus que tengan el fenotipo deseado, puesto que el sistema hospedador usado (competente en IFN frente a deficiente en IFN) aplica la presión de selección apropiada.

Por ejemplo, puede compararse el crecimiento de virus (según lo medido mediante títulos) en diversas células, líneas celulares, o sistemas de modelos animales que expresen IFN y los componentes de la respuesta a IFN, frente a células, líneas celulares, o sistemas de modelos animales deficientes en IFN o componentes de la respuesta a IFN. Con este fin, puede compararse el crecimiento de virus en líneas celulares tales como células VERO (que son deficientes en IFN) frente a células MDCK (que son competentes en IFN). Como alternativa, pueden obtenerse y establecerse

60 líneas celulares deficientes en IFN a partir de animales criados o manipulados genéticamente para ser deficientes en el sistema de IFN (por ejemplo, ratones mutantes STAT1 -/). Puede medirse el crecimiento de virus en dichas líneas celulares, en comparación con células competentes en IFN obtenidas, por ejemplo, de animales de tipo silvestre (*por ejemplo*, ratones de tipo silvestre).

65

Pueden manipularse líneas celulares que son competentes en IFN y que se sabe que soportan el crecimiento de virus de tipo silvestre para que sean deficientes en IFN (*por ejemplo*, eliminando completamente STAT1, IRF3, PKR, etc.). Pueden usarse técnicas que se conocen bien en la técnica para la propagación de virus (véase, *por ejemplo*, los ejemplos de trabajo *infra*). Puede compararse el crecimiento de virus en la línea celular competente en IFN convencional frente a la línea celular manipulada genéticamente deficiente en IFN.

También pueden usarse sistemas animales. Por ejemplo, para la gripe, el crecimiento en huevos jóvenes, embrionados deficientes en IFN, *por ejemplo*, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 días de edad, puede compararse con el crecimiento en huevos competentes en IFN más viejos, *por ejemplo*, de aproximadamente 10 a 12 días de edad. Con este fin, pueden usarse técnicas bien conocidas en la técnica para la infección y propagación en huevos (*por ejemplo*, véase los ejemplos de trabajo, *infra*). Como alternativa, el crecimiento en ratones STAT1 -/- deficientes en IFN puede compararse con ratones de tipo silvestre competentes en IFN. En otra alternativa más, el crecimiento en huevos embrionados deficientes en IFN producidos por, *por ejemplo*, aves de corral transgénicas STAT1 -, puede compararse con el crecimiento en huevos competentes en IFN producidos por aves de corral de tipo silvestre.

Para fines de selección, sin embargo, pueden usarse sistemas deficientes en IFN transitorios en lugar de sistemas manipulados genéticamente. Por ejemplo, el sistema hospedador puede tratarse con compuestos que inhiban la producción de IFN y/o componentes de la respuesta a IFN (*por ejemplo*, fármacos, anticuerpos contra IFN, anticuerpos contra el receptor de IFN, inhibidores de PKR, moléculas antisentido y ribozimas, etc.). El crecimiento de virus puede compararse en controles no tratados competentes en IFN frente a sistemas tratados deficientes en IFN. Por ejemplo, huevos más viejos que son competentes en IFN pueden tratarse previamente con dichos fármacos antes de la infección con el virus a seleccionar. El crecimiento se compara con el alcanzado en huevos de control no tratados de la misma edad.

Los métodos de selección proporcionan una selección simple y fácil para identificar virus mutantes con actividad antagonista de IFN suprimida mediante la incapacidad del virus mutante para crecer en entornos sensibles a IFN, en comparación a la capacidad del virus mutante para crecer en entornos deficientes en IFN. Los métodos de selección también pueden usarse para identificar virus mutantes con actividad antagonista de IFN alterada, aunque no suprimida, midiendo la capacidad del virus mutante para crecer en entornos sensibles a IFN, *por ejemplo*, huevos embrionados de 10 días de edad o células MDCK y en entornos deficientes en IFN, *por ejemplo*, huevos embrionados de 6 a 7 días de edad o células Vero. Por ejemplo, los virus de la gripe que muestren títulos al menos un log inferiores en huevos de 10 días de edad frente a huevos de 6-7 días de edad, se considerarán alterados en su capacidad para inhibir la respuesta a IFN. En otro ejemplo, los virus de la gripe que muestren un título al menos un log inferior en huevos de 12 días de edad (que montan una alta respuesta a IFN) frente a huevos de 10 días de edad (que montan una respuesta a IFN moderada), se consideran parcialmente alterados en su capacidad para antagonizar la respuesta a IFN, y se consideran candidatos para vacuna atractivos.

Los métodos de selección también abarcan identificar los virus mutantes que inducen respuestas a IFN. De acuerdo con los métodos de selección, la inducción de respuestas a IFN puede medirse ensayando los niveles de expresión de IFN o expresión de genes diana o genes informadores inducidos por IFN después de la infección con el virus mutante o de la activación de transactivadores implicados en la expresión de IFN y/o la respuesta a IFN.

La inducción de respuestas a IFN puede determinarse midiendo el estado fosforilado de componentes de la vía de IFN después de la infección con el virus mutante de ensayo, *por ejemplo*, IRF-3, que se fosforila en respuesta al ARN de doble cadena. En respuesta al IFN de tipo I, Jak1 quinasa y TyK2 quinasa, subunidades del receptor de IFN, STAT1, y STAT2 se fosforilan en tirosina rápidamente. De este modo, para determinar si el virus mutante induce respuestas a IFN, se infectan células, tales como células 293, con el virus mutante de ensayo y después de la infección, las células se lisan. Los componentes de la vía de IFN, tales como Jak1 quinasa o TyK2 quinasa, inmunoprecipitan a partir de los lisados de células infectadas, usando sueros o anticuerpos policlonales específicos, y el estado fosforilado en tirosina de la quinasa se determina mediante ensayos de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfotirosina (*por ejemplo*, véase Krishnan *et al.* 1997, Eur. J. Biochem. 247: 298-305). Un estado fosforilado potenciado de cualquiera de los componentes de la vía de IFN después de la infección el virus mutante, podría indicar inducción de las respuestas a IFN por el virus mutante.

Los sistemas de selección pueden abarcar medir la capacidad para unir secuencias de ADN específicas o la translocación de factores de transcripción inducida en respuesta a infección vírica, *por ejemplo*, IRF3, STAT1, STAT2, etc. En particular, STAT1 y STAT2 se fosforilan y se translocan desde el citoplasma al núcleo en respuesta a IFN de tipo I. La capacidad para unirse a secuencias de ADN específicas o la translocación de factores de transcripción puede medirse mediante técnicas conocidas por los especialistas en la técnica, *por ejemplo*, ensayos de desplazamiento en gel de electromovilidad, tinción celular, etc.

La inducción de respuestas a IFN puede determinarse midiendo la activación transcripcional dependiente de IFN después de la infección con el virus mutante de ensayo. En esta realización, la expresión de genes que se sabe son inducidos por IFN, *por ejemplo*, Mx, PKR, 2-5-oligoadenilatosintetasa, complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I, etc., puede analizarse mediante técnicas conocidas por los especialistas en la técnica (*por ejemplo*, transferencias de northern, transferencias de western, PCR, etc.). Como alternativa, se manipulan células de ensayo tales como células de riñón embrionario humano o células de sarcoma osteogénicas humanas, para expresar de forma transitoria o constitutiva genes informadores tales como el gen informador de la luciferasa o gen informador de la cloranfenicol

transferasa (CAT) bajo el control de un elemento de respuesta estimulado por interferón, tal como el promotor estimulado por IFN del gen ISG-54K (Bluyssen *et al.*, 1994, Eur. J. Biochem. 220: 395-402). Las células se infectan con el virus mutante de ensayo y se compara el nivel de expresión del gen informador con el de células no infectadas o células infectadas con el virus de tipo silvestre. Un aumento en el nivel de expresión del gen informador después de la infección con el virus de ensayo indicaría que el virus mutante de ensayo está induciendo una respuesta a IFN.

Los sistemas de selección pueden abarcar medir la inducción de IFN determinando si un extracto de la célula o huevo infectado con el virus mutante de ensayo es capaz de conferir actividad protectora contra infección vírica. Más específicamente, se infectan grupos de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad con el virus mutante de ensayo o el virus de tipo silvestre. Aproximadamente de 15 a 20 horas después de la infección, se recoge el líquido alantoico y se ensaya la actividad de IFN determinando la dilución más alta con actividad protectora frente a la infección por VSV en células de cultivo tisular, tales como células CEF.

### 5.3 Propagación del virus en sustratos de cultivo deficientes en interferón

La presente invención se refiere a nuevos métodos y sustratos para la propagación de virus de la gripe. La invención se refiere a sustratos deficientes en IFN y métodos para propagar 5 veces virus en estos sustratos. En particular, la invención se refiere a métodos para propagar virus en huevos embrionados inmaduros, de seis a nueve días de edad, que no se usan normalmente para cultivar virus debido a su estado frágil y su cavidad alantoica más pequeña. De acuerdo con la presente invención, huevos embrionados inmaduros abarca huevos de seis a nueve días de edad.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, los virus que pueden cultivarse en huevos embrionados inmaduros se seleccionan a partir de cepas de origen natural, variantes o mutantes, virus mutagenizados, virus reordenantes y/o manipulados genéticamente. Los métodos de la presente invención abarcan cultivar los virus en huevos de seis a nueve días de edad, usando preferiblemente condiciones de cultivo apropiadas (véase, *por ejemplo*, las condiciones de cultivo que se muestran en la Sección 6 a continuación) y recoger los virus de la progenie. Abarcando los métodos de la invención, el cultivo de virus en huevos embrionados inmaduros de seis a nueve días de edad, y siendo particularmente atractivos para cultivar virus adecuados para su uso en formulaciones de vacuna.

La invención también abarca métodos y sustratos deficientes en IFN para el cultivo y aislamiento de virus de origen natural o mutantes manipulados genéticamente que tienen actividad antagonista de IFN alterada. Los sustratos deficientes en IFN que pueden usarse para soportar el crecimiento de los virus mutantes atenuados son líneas celulares o huevos embrionados inmaduros de seis a nueve días de edad que son deficientes en IFN, con la condición de que dichas líneas celulares no sean células Vero y no sean líneas celulares STAT (-), *por ejemplo*, células recombinantes o líneas celulares que se manipulan para ser deficientes en IFN, o huevos embrionados obtenidos de aves deficientes en IFN, especialmente aves de corral (*por ejemplo*, pollos, patos, pavos) incluyendo bandadas que se crían para que sean deficientes en IFN o aves transgénicas (*por ejemplo*, knockout para STAT1). Dichas líneas celulares o huevos pueden manipularse genéticamente para expresar transgenes que codifican inhibidores del sistema de IFN, *por ejemplo*, mutantes negativos dominantes, ARN antisentido, ribozimas, inhibidores de la producción de IFN, inhibidores de la señalización de IFN, y/o inhibidores de genes antivirales inducidos por IFN. Como alternativa, pueden tratarse dichas líneas celulares o huevos con un compuesto que inhibe la producción de IFN y/o la vía de IFN, *por ejemplo*, fármacos, anticuerpos, moléculas antisentido, moléculas de ribozima que se dirigen al gen STAT1, y/o genes antivirales inducidos por IFN.

De acuerdo con la presente invención, huevos de gallina embrionados inmaduros abarca huevos que son de seis a nueve días de edad de forma natural.

#### 5.3.1 Sustratos naturales deficientes en IFN

En una realización, la presente invención se refiere a cultivar virus mutantes de la gripe, de origen natural y manipulados genéticamente, en sustratos no convencionales, tales como huevos embrionados inmaduros que no han desarrollado todavía un sistema de IFN. Normalmente no se usan huevos embrionados inmaduros para cultivar virus debido a su estado frágil y a su volumen alantoico más pequeño. La presente invención abarca cultivar virus mutantes en huevos embrionados de seis a nueve días de edad; preferiblemente cultivar virus mutados en huevos embrionados de - días de edad y más preferiblemente, en huevos de 6 a 8 días de edad.

La presente invención también abarca métodos para cultivar y aislar virus de la gripe mutados que tengan actividad antagonista de IFN alterada en células y líneas celulares que no tengan de forma natural una vía de IFN o que tengan una vía de IFN deficiente o que tengan una deficiencia en el sistema de IFN, *por ejemplo*, niveles bajos de expresión de IFN en comparación con células de tipo silvestre.

#### 5.3.2 Sustratos deficientes en IFN manipulados genéticamente

La presente invención se refiere a métodos para cultivar y aislar virus de la gripe mutados que tengan actividad antagonista de IFN alterada, en un sustrato deficiente en IFN manipulado genéticamente. En otra realización más, pueden manipularse genéticamente líneas celulares para que sean deficientes en IFN. La presente abarca líneas celulares en las cuales se muta un gen esencial para la síntesis de IFN, la vía de IFN, y/o un gen o genes antiviral o antivirales inducidos por IFN.

La invención proporciona líneas celulares recombinantes, en las cuales uno o más genes esenciales para la vía de IFN, *por ejemplo*, receptor de interferón, etc., se han alterado, *es decir*, es un “knockout”. Dicha línea celular puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica para alterar un gen en el cromosoma de una célula o animal. Dichas técnicas incluyen, aunque sin limitación microinyección pronuclear (Hoppe & Wagner, 1989, Patente de Estados Unidos N° 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152); fijación de objetivos génicos en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, 1989, Cell 56: 313); electroporación de embriones (Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3: 1803); y transferencia génica mediada por espermatozoides (Lavitrano *et al.*, 1989, Cell 57: 717); etc. Para una revisión de dichas técnicas, véase Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171 los método de recombinación homóloga para alterar genes en el genoma de ratón se describen, por ejemplo, en Capecchi (1989, Science 244: 1288) y Mansour *et al.* (1988, Nature 336: 348-352).

### 5.3.3 Sustratos deficientes en IFN transitorios

Las líneas celulares, o huevos pueden tratarse previamente con compuestos que inhiben el sistema de IFN. De acuerdo con la presente invención, los compuestos que inhiben la síntesis de IFN, o la actividad o la expresión de los componentes del sistema de IFN pueden usarse para pretratar hospedadores, *por ejemplo*, compuestos que inhiben la síntesis de IFN, la actividad de IFN, el receptor de IFN, otras dianas en la vía de transducción de señales de IFN, o que inhiben la actividad de genes antivirales inducidos por IFN. Los ejemplos de compuestos que pueden usarse de acuerdo con la presente invención, incluyen, aunque sin limitación, moléculas de ácido nucleico, anticuerpos, péptidos, antagonistas del receptor de IFN, inhibidores de la vía de STAT1, inhibidores de PKR, etc. De acuerdo con la presente invención, moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas antisentido, ribozimas y moléculas de triple hélice que tienen como objetivo genes que codifican componentes esenciales del sistema de IFN, por ejemplo, STAT1. Las moléculas de ácido nucleico también abarcan nucleótidos que codifican mutantes negativos dominantes de componentes del sistema de IFN; *por ejemplo*, antes de la infección con el mutante viral, las células pueden transfectarse con un ADN que codifica un mutante de señalización truncado incompetente del receptor de IFN.

Los mutantes negativos dominantes que pueden usarse de acuerdo con la presente invención para inhibir la vía de IFN incluyen versiones deficientes en quinasa de Jak1, TyK2 o factores de transcripción que carecen de dominios de unión a ADN STAT1, y STAT2 (véase *por ejemplo*, Krishnan *et al.*, 1997, Eur. J. Biochem. 247: 298-305)

## 6. Ejemplo

### 35 Generación y caracterización de mutantes de truncamiento de NS1 de virus de la gripe A

#### 6.1 Materiales y métodos

El virus de la gripe A/PR/8/34 (PR8) se propagó en huevos de gallina embrionados de 10 días de edad a 37°C. El virus de la gripe A 25A-1, un virus reordenante que contenía el segmento NS de la cepa adaptada al frío A/Leningrad/134/47/57 y los genes restantes del virus PR8 (Egorov *et al.*, 1994, Vopr. Virusol. 39: 201-205; Shaw *et al.*, 1996, en Options of the control of influenza III, eds. Brown, Hampson Webster (Elsevier Science) págs. 433-436) se cultivó en células Vero a 34°C. El virus 25A-1 es sensible a la temperatura en células de mamífero, y se usó como un virus ayudante para el rescate del virus transfectante NS1/99. Se usaron células Vero y células MDCK mantenidas en medio mínimo esencial (MEM) que contenía 1 µg/ml de tripsina (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) para el cultivo de virus de la gripe. Las células Vero también se usaron para la selección, purificación, en placa y titulación del virus NS1/99. Las células MDCK se mantuvieron en DMEM (medio mínimo esencial de Dulbecco) que contenían suero fetal de ternero inactivado con calor al 10%. Las células Vero se cultivaron en medio AIM-V (Life Technologies, Grand Island, NY).

El plásmido pT3NS1/99, que contiene un extremo C-terminal de 99 aminoácidos truncado a partir de NS1, se preparó de la siguiente manera. En primer lugar, se amplificó pPUC19-T3/NS PR8, que contenía el gen NS completo del virus PR8 flanqueado por el promotor de ARN polimerasa T3 y el sitio de restricción *BpuAI* mediante PCR inversa (Ochman *et al.*, 1988, Genetics 120: 621-623) usando los cebadores apropiados. El ADNc obtenido que de este modo contenía el gen NS truncado se fosforiló, se trató con fragmentos de Klenow, se auto-ligó y se propagó en la cepa de *E.coli* TG1. La construcción obtenida después de la purificación se nombró como pT3NS1/99 y se verificó mediante secuenciación. Los plásmidos para la expresión de proteínas NP, PB1, PB2 y PA del virus PR8 (pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2 y pHMG-PA) se describieron anteriormente (Pleschka *et al.*, 1996, J. Virol. 70: 4188-4192). pPOLI-NS-RB se preparó sustituyendo la fase de lectura abierta CAT de pPOLI-CAT-RT (Pleschka *et al.*, 1996, J. Virol. 70: 4188-4192) dentro del producto de RT-PCR obtenido a partir de la región codificante del gen NS del virus de la gripe A/WSN/33 (WSN). Este plásmido expresa el segmento de ARN viral específico de NS del virus WSN bajo el control de un promotor de la polimerasa I humana truncado.

La generación del virus NS1/99 se realizó mediante transfección de ribonucleoproteína (RNP) (Luytjes *et al.*, 1989, Cell 59: 1107-1113). Las RNP se formaron mediante transcripción de ARN polimerasa T3 a partir de pT3NS1/99 li-nealizado con *BpuAI* en presencia de nucleoproteína purificada y polimerasa del virus de la gripe 25A-1 (Enami, *et al.*, 1991, J. Virol. 65: 2711-2713). Los complejos de RNP se transfectaron en células Vero que se habían infectado previamente con virus 25A-1. Las células transfectadas se incubaron durante 18 horas a 37°C, y el sobrenadante

se pasó dos veces en células Vero a 40°C y se purificó en placas tres veces en células Vero recubiertas con una capa superpuesta de medios de agar a 37°C. El virus NS1/99 aislado se analizó mediante RT-PCR usando cebadores específicos. El virus transfectante de tipo silvestre se generó de la siguiente manera: se transfectaron células Vero en placas de 35 mm con plásmidos pHMG-NP, pHMG.PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA y pPOLI-NS-RB, como se ha descrito anteriormente (Pleschka *et al.*, 1996, *J. Virol.* 70: 4188-4192). Dos días después de la transfección, las células se infectaron con  $5 \times 10^4$  pfu de virus delNS1 y se incubaron dos días más a 37°C. El sobrenadante celular se pasó una vez en células MDCK y dos veces en huevos embrionados de gallina. Los virus transfectantes se clonaron mediante dilución limitante en huevos. El ARN genómico del virus transfectante NS1/99 purificado se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, como se ha descrito anteriormente (Zheng *et al.*, 1996, *Virology* 217: 242-251). La expresión de una proteína NS1 truncada por el virus NS1/99 se verificó mediante inmunoprecipitado de extractos celulares infectados marcados usando un antisuero policlonal de conejo contra NS1.

La cavidad alantoica de los huevos de gallina embrionados, de 6, 10 y 14 días de edad, se inoculó con aproximadamente  $10^3$  pfu de virus PR8, NS1/99, o delNS1 (en el cual todo el gen NS1 se deleta), se incubaron a 37°C durante dos días, y los virus presentes en el líquido alantoico se titularon mediante ensayos de hemaglutinación (HA).

Se inocularon por vía intranasal grupos de 5 ratones BALB/c (Taconic Farms) con  $5 \times 10^6$  pfu,  $1,5 \times 10^5$  pfu, o  $5 \times 10^3$  pfu de virus A/PR/8/34 (PR8) o NS1/99 de tipo silvestre. Las inoculaciones se realizaron con anestesia usando 50  $\mu$ l de MEM que contenía la cantidad apropiada de unidades formadoras de placas del virus apropiado. Los animales se controlaron diariamente, y se sacrificaron cuando se observó que estaban a punto de morir. En un experimento posterior, todos los ratones supervivientes se estimularon durante cuatro semanas después con una dosis de 100DL<sub>50</sub> de virus PR8 de tipo silvestre. Todos los procedimientos estaban de acuerdo con las directrices de NIH de cuidado y uso de animales de laboratorio.

## 6.2 Resultados: Atenuación de virus de la gripe a mediante deletaciones de NS1

Los solicitantes han demostrado previamente que un virus de la gripe A en el cual se deletó el gen NS1 (virus delNS1) es capaz de crecer hasta títulos de aproximadamente  $10^7$  pfu/ml en células deficientes en la producción de interferón (IFN) del tipo I, tales como células Vero. Sin embargo, este virus estaba alterado en su capacidad para replicar y causar enfermedad en ratones (García-Sastre *et al.*, 1998, *Virology* 252: 324). Por el contrario, el virus delNS1 era capaz de crecer en y matar ratones STAT1 *-/-*. Estos resultados demostraron que la proteína NS1 del virus de la gripe A es un factor de virulencia implicado en la inhibición de las respuestas antivirales del hospedador mediadas por IFN de tipo I. Se realizaron los siguientes experimentos para determinar si se podía generar virus de la gripe con características de virulencia intermedias entre virus de tipo silvestre y virus delNS1 deletando porciones del gen NS1, y si algunos de estos virus podía tener características óptimas para usarse con vacunas atenuadas vivas contra virus de la gripe, *es decir*, estabilidad y un equilibrio apropiado entre atenuación, inmunogenicidad y crecimiento en sustratos adecuados para la preparación de vacuna, tales como huevos de gallina embrionados.

Para ensayar esta hipótesis, se generó un virus de la gripe A/PR/8/34 (PR8) en el cual el gen NS1 se ha modificado para dirigir la expresión de una proteína de NS1 truncada que contenía sólo 99 aminoácidos en el extremo amino terminal en común con los 230 aminoácidos de la proteína NS1 de tipo silvestre. Este virus (NS1/99) se obtuvo mediante transfección de RNP de un gen NS manipulado artificialmente usando virus ayudante 25A-1, como se ha descrito anteriormente (García-Sastre *et al.*, 1998, *Virology* 252: 324). El análisis de la expresión de NS1 en células infectadas con el virus mostró la naturaleza truncada de la proteína NS1 del virus NS1-99.

Se analizó la capacidad de delNS1, NS1-99 y PR8 de tipo silvestre para crecer en huevos de gallina embrionados de diferentes edades. El fundamento para este experimento viene del hecho de que la capacidad de huevos embrionados para sintetizar y para responder al IFN de tipo I bajo estímulos apropiados depende de la edad. De hecho, tanto la inductibilidad como la sensibilidad a IFN comienzan a una edad de aproximadamente 10 días, y después aumentan exponencialmente con la edad (Sekellick *et al.*, 1990, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 997; Sekellick & Marcus, 1985, *J. Interferón Res.* 5: 657). De este modo, el uso de huevos de diferentes edades representa un sistema único para ensayar la capacidad de diferentes virus para inhibir respuestas a IFN. Se inocularon huevos de 6, 10 y 14 días de edad con aproximadamente  $10^3$  pfu de virus PR8, NS1-99 o delNS1, se incubaron a 37°C durante 2 días, y los virus presentes en el líquido alantoico se titularon mediante ensayo de hemaglutinación (HA). Como se muestra en la Tabla 3, mientras que el virus de tipo silvestre creció a títulos de HA similares en huevos embrionados de 6, 10 y 14 días de edad, delNS1 se replicó solamente hasta un título de HA detectable en huevos de 6 días de edad. Por el contrario, el virus NS1-99 mostró un comportamiento intermedio entre delNS1 y los virus de tipo silvestre, y fue capaz de crecer a títulos HA similares a los del virus de tipo silvestre en huevos de 10 días de edad, pero no en huevos de 14 días de edad.

65

## ES 2 281 177 T3

TABLA 3

*Replicación del virus en huevos de gallina embrionados*

Virus	Edad de los huevos	Título de hemaglutinación <sup>1</sup>		
		6 días	10 días	14 días
WT PR8 <sup>2</sup>		2.048	4.096	1.071
NS1/99		N.D. <sup>3</sup>	2.048	< 2
delNS1		64	< 2	< 2

<sup>1</sup> Los títulos representan la dilución más alta con actividad hemaglutinante.

<sup>2</sup> Virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo silvestre.

<sup>3</sup> No determinado.

Las características de atenuación del virus NS1-99 se determinaron después en ratones. Para este fin, se infectaron por vía intranasal grupos de 5 ratones BALB/c con  $5 \times 10^6$  pfu,  $1,5 \times 10^5$  o  $1,5 \times 10^3$  pfu de virus PR8 o NS1-99 de tipo silvestre. Después se controló la supervivencia de los ratones durante 3 semanas. Los resultados se dan en la Tabla 4. El virus NS1-99 tenía una DL50 al menos tres log más alta que la del virus de tipo silvestre.

TABLA 4

*Atenuación de virus NS1-99 en ratones*

Virus	Dosis de Infección (pfu):	Supervivientes		
		$5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$5 \times 10^3$
WT PR8 <sup>1</sup>		1/5	1/5	1/5
NS1/99		3/5	5/5	5/5

<sup>1</sup> Virus de la gripe APR/8/34 de tipo silvestre.

### 7. Ejemplo

#### *Generación y caracterización de mutantes de truncamiento de NS1 en virus de la gripe B*

##### *7.1 Materiales y métodos*

Los detalles experimentales son similares a los de la Sección 6.1. Se obtuvieron dos virus de la gripe B mutantes, B/610B5B/201 (B/201) y B/AWBY-234, de 127 aminoácidos y 90 aminoácidos de longitud (proteínas NS1 truncadas en el extremo C), respectivamente (Norton *et al.*, 1987 *Virology* 156: 204; Tobita *et al.*, 1990 *Virology* 174: 314) a partir de experimentos de coinfección en cultivo tisular que implicaba virus B/Yamagata/1/73 (B/Yam) y A/Aichi/2/68 en presencia de anticuerpo antiviral-A (H3N2). El crecimiento de los virus de la gripe mutados en huevos embrionados de diversas edades se comparó con el del virus parental B/Yam, que posee una proteína NS1 de 281 aminoácidos de tipo silvestre. Se inocularon huevos de 6, 10 y 14 días de edad con aproximadamente  $10^3$  pfu de virus B/Yam, B/201 o B/AWBY-234, se incubaron a 35°C durante 2 días, y los virus presentes en el líquido alantoico se titularon mediante un ensayo de HA.

Además, se determinaron las características de atenuación de virus B/201 y B/ABWY-234 en ratones. Se infectaron por vía intranasal grupos de tres ratones BALB/c con  $3 \times 10^5$  pfu de virus B/Yam, B/201 de tipo silvestre o B/AWBY-234 mutantes, y se determinó la capacidad de estos virus para replicar midiendo títulos virales en los pulmones en el día 3 después de la infección, puesto que el B/Yam de tipo silvestre no induce signos aparentes de enfermedad en ratones.

## 7.2 Resultados

TABLA 5

*Replicación del virus de la gripe B en huevos de gallina embrionados*

Virus	Edad de los huevos	Título de hemaglutinación		
		6 días	10 días	14 días
B/Yam		362	256	< 2
B/201		32	< 2	< 2
B/AWBY-234		8	< 2	< 2

Los resultados del cultivo de virus de la gripe B mutante de tipo silvestre en huevos de gallina embrionados, que se muestran en la Tabla 5, demuestran que, como en el caso de los virus de la gripe A, un truncamiento carboxi-terminal del NS1 del virus de la gripe B es responsable de un rendimiento de replicación inferior en huevos de gallina embrionarios más viejos que montan una respuesta a IFN eficaz. Este descubrimiento indica que el NS1 del virus de la gripe B también está implicado en la inhibición de las respuestas a IFN del hospedador, y que las deleciones del gen NS1 del virus de la gripe B dan como resultado un fenotipo atenuado.

Los resultados de los experimentos de replicación en ratones se dan en la Tabla 6. Los títulos de virus B/201 y B/AWBY-234 eran aproximadamente de tres log de magnitud inferiores que los títulos de B/Yam, lo que indicaba que los truncamientos del dominio carboxi-terminal del NS1 del virus de la gripe B son responsables de un fenotipo atenuado en ratones.

TABLA 6

*Replicación del virus de la gripe B en pulmones de ratón*

Virus	Títulos en el pulmón en el día 3 después de la infección (pfu/pulmón)		
B/Yam	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$3 \times 10^4$
B/201	30	< 10	60
B/AWBY-234	< 10	40	< 10

#### 8. Protección contra infección por virus de la gripe de tipo silvestre en ratones inmunizados con virus de la gripe A y B que contienen deleciones en sus proteínas NS1

Para determinar si los ratones inmunizados con virus de la gripe A y B atenuados que contenían proteínas NS1 truncadas estaban protegidos contra la estimulación con sus virus de tipo silvestre respectivos, se realizó el siguiente experimento. Se inmunizaron por vía intranasal ratones BALB/c con virus A/NS1-99 y tres semanas después se infectaron con 100 DL<sub>50</sub> de virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo silvestre. Los animales inmunizados estaban protegidos contra la muerte, mientras que todos los ratones sin tratamiento previo de control murieron después de la estimulación (véase Tabla 7). En un segundo experimento, se inmunizaron por vía intranasal ratones BALB/c con los virus de la gripe B B/201 o B/AWBY-234, que expresaban proteínas de NS1 truncadas. Tres semanas después los ratones se estimularon con  $3 \times 10^5$  pfu de virus de la gripe B/Yam/1/73 de tipo silvestre. Puesto que esta cepa de virus de la gripe B no induce síntomas de enfermedad en ratones, el grado de protección se determinó midiendo los títulos de virus en los pulmones en el día 3 después de la estimulación. Mientras que los animales de control sin tratamiento previo tenían títulos de aproximadamente  $10^4$  pfu/pulmón, no se detectaron virus en pulmones de animales inmunizados (véase Tabla 8). Estos descubrimientos sugieren que el virus de la gripe A así como el de la gripe B que contenían genes NS1 modificados son capaces de inducir una respuesta inmune en ratones que es completamente protectora contra una posterior estimulación con virus de tipo silvestre.

## ES 2 281 177 T3

TABLA 7

*Supervivencia de ratones inmunizados con virus de la gripe A/NS1-99 después de la estimulación con 100 DL<sub>50</sub> de virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo silvestre*

<u>Dosis de Inmunización de Virus A/NS1-99</u>	<u>Cantidad de Supervivientes/Total</u>
5 x 10 <sup>6</sup> pfu	3/3
1,5 x 10 <sup>5</sup> pfu	4/4
PBS	0/5

TABLA 8

*Títulos en el pulmón en ratones inmunizados con virus de la gripe B/201 y B/AWBY-234 después de la estimulación con 3 x 10<sup>5</sup> pfu de virus de la gripe B/Yamagata/73 de tipo silvestre*

<u>Dosis de Inmunización</u>	<u>Títulos en el pulmón (pfu/pulmón)</u>
3 x 10 <sup>5</sup> pfu de B/201	< 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup>
3 x 10 <sup>5</sup> pfu de B/AWBY-234	< 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup> , < 10 <sup>1</sup>
PBS	2,5 x 10 <sup>4</sup> , 1 x 10 <sup>4</sup> , 1,7 x 10 <sup>4</sup> , 3 x 10 <sup>4</sup> , 5 x 10 <sup>4</sup>

### 9. Ejemplo

*Inducción de interferón de tipo I en huevos embrionados infectados con virus delNS1*

A continuación se determinó la capacidad del virus delNS1, un virus de la gripe A que carece del gen NS1, para inducir la secreción de IFN de tipo I en huevos de gallina embrionados. Para este fin, se infectaron grupos de dos huevos de gallina de 10 días de edad con 5 x 10<sup>3</sup> pfu de virus delNS1 o PR8 de tipo silvestre. Dieciocho horas después de la incubación a 37°C, se recogió el líquido alantoico y se dializó frente a un pH ácido durante una noche, para inactivar los virus infecciosos. Después del tratamiento con pH ácido, se dializaron muestras frente a PBS, y después se ensayó su actividad de IFN determinando la dilución más alta con actividad protectora contra infección por VSV (aproximadamente 200 pfu) en células CEF. Los resultados que se muestran en la Tabla 9 indican que en ausencia de NS1, los virus de la gripe A son mayores inductores de IFN.

TABLA 9

*Inducción de IFN en huevos*

<u>Virus</u>	<u>IFN (U/ml)</u>
PR8	< 16, < 16
delNS1	400, 400
simulacro	< 16, < 16

### 10. Ejemplo

*Actividad antiviral del virus delNS1*

La eliminación del gen antagonista de IFN (NS1) del virus de la gripe A puede dar como resultado un virus con la capacidad para inducir altos niveles de IFN. Si este es el caso, el virus delNS1 “interferirá” con la replicación de virus sensibles a IFN. Para ensayar esta posibilidad, los solicitantes investigaron la capacidad del virus delNS1 para inhibir la replicación del virus de la gripe A/WSN/33 (WSN), una cepa de laboratorio de virus de la gripe usada comúnmente, en huevos. Como puede observarse en la Figura 1, el tratamiento con solamente 2 pfu de virus delNS1 fue capaz de reducir los títulos finales de virus WSN en el líquido alantoico en un log. Además, el tratamiento con 2 x 10<sup>4</sup> pfu de virus delNS1 dio como resultado prácticamente la completa supresión de la replicación de WSN en huevos. El virus delNS1 también fue capaz de interferir con la replicación en huevos de otras cepas de virus de la gripe A (H1N1 y H3N2), virus de la gripe B y un virus diferente tal como virus Sendai (Figura 2).

Estimulados por estos resultados, los solicitantes determinaron a continuación la capacidad del virus delNS1 para interferir con la replicación del virus de la gripe de tipo silvestre en ratones. Aunque el tratamiento con IFN de tipo I en cultivo tisular previene la replicación del virus de la gripe A *in vitro*, el tratamiento de ratones con IFN no es capaz de inhibir la replicación de virus de la gripe (Haller, 1981, Current top Microbiol Immunol 92: 25-52). Esto es cierto para la mayoría de las cepas criadas con endogamia de ratones, excepto para los ratones A2G. Los ratones A2G, así como una proporción significativa de ratones de tipo silvestre (aproximadamente el 75%), contienen al menos un alelo Mx1 intacto, mientras que la mayoría de las cepas de laboratorio son Mx1<sup>-/-</sup> (Haller, 1986, Current Top Microbiol Immunol 127: 331-337). La proteína Mx1, que es un homólogo de la proteína MxA humana (Aebi, 1989, Mol. Cell. Biol. 11: 5062), es un potente inhibidor de la replicación del virus de la gripe (Haller, 1980, Nature 283: 660). Esta proteína no se expresa de forma constitutiva, pero su expresión se induce de forma transcripcional por IFN de tipo I. Por tanto, pueden usarse ratones A2G para ensayar la capacidad de inductores de IFN para estimular una respuesta antiviral contra virus de la gripe A (Haller, 1981, Current Top Microbiol Immunol 92: 25-52).

Los Solicitantes infectaron por vía intranasal ocho ratones A2G de 4 semanas de edad con  $5 \times 10^6$  pfu de un aislado de virus de la gripe A/PR/8/34 altamente patogénico (Haller, 1981, Current Top Microbiol Immunol 92: 25-52). La mitad de los ratones recibió un tratamiento intranasal con  $5 \times 10^6$  pfu de delNS1, 24 horas antes con respecto a la infección por PR8. Los otros cuatro ratones se trataron con PBS. Se controlaron los cambios de peso corporal y la supervivencia. Estos resultados demuestran que el tratamiento con delNS1 fue capaz de proteger ratones A2G contra la muerte inducida por virus de la gripe y contra la pérdida de peso corporal. El mismo tratamiento no fue eficaz en ratones Mx1<sup>-/-</sup>, lo que indicaba que el mecanismo de protección estaba mediado por Mx1, es decir por IFN.

### 11. Ejemplo

#### *Propiedades antitumorales de virus delNS1 en ratones*

Dado que el IFN de tipo I y/o los inductores del IFN de tipo I han demostrado tener actividades antitumorales (Belardelli y Gresser, 1996 Immunology Today 17: 369-372; Qin *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 14411-14416), es posible que el tratamiento de tumores con virus delNS1 pudiera mediar en la regresión tumoral. Como alternativa, el virus delNS1 podría tener propiedades oncolíticas, *es decir*, puede ser capaz de crecer específicamente en y matar células tumorales, muchas de las cuales se sabe que tienen deficiencias en el sistema de IFN. Para ensayar la actividad antitumoral del virus delNS1, se realizó el siguiente experimento usando la línea celular de carcinoma de ratón CT26.WT en un modelo tumoral de ratón para metástasis pulmonar (Restifo *et al.*, 1998 Virology 249: 89-97). Se inyectaron  $5 \times 10^5$  células CT26.WT por vía intravenosa en ratones BALB/c de 6 semanas de edad. La mitad de los ratones se trataron por vía intranasal con  $10^6$  pfu de virus delNS1 cada 24 horas en los días 1, 2 y 3 después de la inoculación. Doce días después de la inyección del tumor, se sacrificaron los ratones y se contaron las metástasis pulmonares. Como se muestra en la Tabla 10, el tratamiento con delNS1 medió una regresión significativa de la metástasis pulmonar de ratones.

TABLA 10

*Actividad antitumoral del virus delNS1 en ratones BALB/C inyectados con células tumorales CT26.WT*

	<u>Cantidad de metástasis pulmonares</u>	
	<u>Tratado con PBS</u>	<u>Tratado con delNS1</u>
Ratón 1	> 250	120
Ratón 2	> 250	28
Ratón 3	> 250	9
Ratón 4	> 250	6
Ratón 5	> 250	2
Ratón 6	> 250	1

### 12. Ejemplo

#### *La proteína NS1 inhibe la translocación de IRF-3 durante la infección con virus de la gripe*

Los resultados descritos en este documento sugieren que la proteína NS1 del virus de la gripe es responsable de la inhibición de la respuesta a IFN de tipo I contra el virus, y que las mutaciones/delecciones en esta proteína dan como resultado virus atenuados debido a una respuesta a IFN potenciada durante la infección. Se sabe que la síntesis de IFN de tipo I durante la infección vírica puede desencadenarse mediante ARN de doble cadena (ARNdc). El IRF-3 es un factor de transcripción que se encuentra normalmente en forma inactiva en el citoplasma de células de mamífero. El

## ES 2 281 177 T3

ARN de doble cadena induce la fosforilación (activación) del factor de transcripción IRF-3, dando como resultado su translocación al núcleo, donde induce la transcripción de genes específicos, incluyendo genes que codifican el IFN de tipo I (Weaver *et al.*, 1998, Mol. Cell. Biol. 18: 1359). Para determinar si el NS1 de la gripe actúa sobre IRF-3, se controló la situación de IRF-3 en células CV1 infectadas con PR8 de tipo silvestre o con virus de la gripe A delNS1. La Figura 3 muestra que la translocación de IRF-3 es mínima en células infectadas con PR8 (en menos del 10% de las células). Por el contrario, aproximadamente el 90% de las células infectadas con delNS1 mostraba situación nuclear de IRF-3. Sorprendentemente, fue posible inhibir parcialmente la translocación de IRF-3 en células infectadas con delNS1, expresando NS1 a partir de un plásmido en dirección trans. Los resultados demuestran que el NS1 de virus de la gripe A es capaz de inhibir la translocación de IRF-3 en células infectadas con el virus. Es probable que el NS1 del virus de la gripe prevenga la activación mediada por ARN<sub>dc</sub> de IRF-3 secuestrando el ARN<sub>dc</sub> generado durante la infección vírica, dando como resultado de este modo una inhibición de la síntesis de IFN.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de vacunas que comprende:

5 (a) propagar en un sustrato deficiente en interferón un virus de la gripe atenuado que tiene una mutación en el gen NS1 que disminuye o elimina la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar la respuesta a interferón celular; y

10 (b) recoger el virus de la progenie,

en el que el sustrato deficiente en interferón es un huevo embrionado inmaduro de seis a nueve días de edad con la condición de que dicho virus no sea virus de la gripe C.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el sustrato deficiente en interferón es la cavidad alantoica de un huevo embrionado inmaduro.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado genéticamente.

20 4. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que la mutación en el gen NS1 es una delección en el extremo C-terminal de NS1.

25 5. El método de la reivindicación 4, en el que el gen NS1 codifica proteínas NS1 truncadas constituidas por restos de aminoácidos 1-60, restos de aminoácido 1-70, restos de aminoácido 1-90, restos de aminoácido 1-99, restos de aminoácido 1-100, restos de aminoácido 1-110, restos de aminoácido 1-120, restos de aminoácido 1-124, o restos de aminoácidos 1-130 del NS1 de tipo silvestre.

30 6. El método de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe atenuado es un virus de la gripe A en el que el gen NS1 esta delecionado.

7. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el huevo es un huevo de gallina de seis a ocho días de edad.

8. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el huevo es un huevo de gallina de seis a siete días de edad.

35 9. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el huevo es un huevo de gallina de seis días de edad.

10. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el huevo es un huevo de gallina de siete días de edad.

11. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el huevo es un huevo de gallina de ocho días de edad.

40 12. El método de la reivindicación 2, en el que el sustrato deficiente en interferón es la cavidad alantoica de un huevo embrionado inmaduro de seis días de edad.

13. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el virus de la gripe atenuado es virus de la gripe A o B.

45 14. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que la mutación en el gen NS1 es responsable del fenotipo atenuado del virus de la gripe.

50 15. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el genoma del virus comprende al menos un segmento obtenido de un virus diferente.

16. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado para codificar un antígeno extraño.

55 17. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado para codificar un antígeno tumoral.

18. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado para codificar un epítipo obtenido de otro virus.

60 19. Un método para la producción de vacunas que comprende:

65 (a) propagar en un sustrato deficiente en interferón un virus de la gripe atenuado que tiene una mutación en el gen NS1 que disminuye o elimina la capacidad del producto del gen NS1 de antagonizar la respuesta a interferón celular; y

(b) recoger el virus de la progenie,

## ES 2 281 177 T3

en el que el sustrato deficiente en interferón es una línea celular deficiente en interferón con la condición de que dicho virus no sea virus de la gripe C y la línea celular deficiente en interferón no sean células Vero y no sean las líneas celulares STAT(-).

- 5 20. El método de la reivindicación 19, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado genéticamente.
21. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que la mutación en el gen NS1 es una delección en el extremo C de NS1.
- 10 22. El método de la reivindicación 21, en el que el gen NS1 codifica proteínas NS1 truncadas constituidas por restos de aminoácidos 1-60, restos de aminoácido 1-70, restos de aminoácido 1-90, restos de aminoácido 1-99, restos de aminoácido 1-100, restos de aminoácido 1-110, restos de aminoácido 1-120, restos de aminoácido 1-124, o restos de aminoácidos 1-130 del NS1 de tipo silvestre.
- 15 23. El método de la reivindicación 19, en el que el virus de la gripe atenuado es un virus de la gripe A en el que el gen NS1 está delecionado.
24. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que el virus de la gripe atenuado es virus de la gripe A o B.
- 20 25. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que la mutación en el gen NS1 es responsable del fenotipo atenuado del virus de la gripe.
26. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que el genoma del virus comprende al menos un segmento obtenido de un virus diferente.
- 25 27. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado para codificar un antígeno extraño
28. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado para codificar un antígeno tumoral.
- 30 29. El método de la reivindicación 19 ó 20, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado para codificar un epítipo obtenido de otro virus.
- 35 30. Un huevo embrionado de seis a nueve días de edad que contiene un virus de la gripe atenuado que tiene una mutación en el gen NS1 que disminuye o elimina la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar la respuesta a interferón celular, en el que dicho virus no es virus de la gripe C.
- 40 31. El huevo embrionado de la reivindicación 30, en el que el virus de la gripe atenuado está contenido en la cavidad alantoica.
32. El huevo embrionado de la reivindicación 30 ó 31, en el que el virus de la gripe atenuado está manipulado genéticamente.
- 45 33. El huevo embrionado de la reivindicación 30, en el que el virus de la gripe atenuado es un virus de la gripe A en el que el gen NS1 está delecionado.
34. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33 en el que el huevo es un huevo de gallina.
- 50 35. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31 ó 32, en el que el genoma del virus comprende al menos un segmento obtenido de un virus diferente.
36. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31 ó 32, en el que la mutación en el gen NS1 es una delección en el extremo C de NS1.
- 55 37. El huevo embrionado de la reivindicación 36, en el que el gen NS1 codifica proteínas truncadas de NS1 constituidas por restos de aminoácidos 1-60, restos de aminoácidos 1-70, restos de aminoácido 1-90, restos de aminoácido 1-99, restos de aminoácido 1-100, restos de aminoácido 1-110, restos de aminoácido 1-120, restos de aminoácido 1-124, o restos de aminoácidos 1-130 del NS1 de tipo silvestre.
- 60 38. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el virus de la gripe es virus de la gripe A o B.
39. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31 ó 32, en el que la mutación en el gen NS1 es responsable del fenotipo atenuado del virus de la gripe.
- 65 40. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el huevo es de seis a ocho días de edad.

## ES 2 281 177 T3

41. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el huevo es de seis a siete días de edad.
42. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el huevo es de seis días de edad.
- 5 43. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el huevo es de siete días de edad.
44. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el huevo es de ocho días de edad.
45. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el virus de la gripe atenuado está manipu-  
10 lado para codificar un antígeno extraño.
46. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el virus de la gripe atenuado está manipu-  
lado para codificar un antígeno tumoral.
- 15 47. El huevo embrionado de la reivindicación 30, 31, 32 ó 33, en el que el virus de la gripe atenuado está manipu-  
lado para codificar un epítipo obtenido de otro virus.
48. Una línea celular deficiente en interferón que contiene un virus de la gripe atenuado que tiene una mutación en  
el gen NS1 que disminuye o elimina la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar la respuesta a interferón  
20 celular, en el que dicho virus no es virus de la gripe C y la línea celular deficiente en interferón no son células Vero y  
no son líneas celulares STAT1 (-).
49. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, en la que el virus de la gripe atenuado es un  
virus de la gripe A en el que el gen NS1 está deletado.
- 25 50. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, en la que el virus de la gripe atenuado está  
manipulado genéticamente.
51. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, en la que la mutación en el gen NS1 es una  
30 delección en el extremo C de NS1.
52. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 51, en la que el gen NS1 codifica proteínas de NS1  
truncadas constituidas por restos de aminoácidos 1-60, restos de aminoácidos 1-70, restos de aminoácido 1-90, restos  
de aminoácido 1-99, restos de aminoácido 1-100, restos de aminoácido 1-110, restos de aminoácido 1-120, restos de  
35 aminoácido 1-124, o restos de aminoácidos 1-130 del NS1 de tipo silvestre.
53. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, 49 ó 50, en la que el virus de la gripe es virus  
de la gripe A o B.
- 40 54. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48 ó 50, en la que la mutación en el gen NS1 es  
responsable del fenotipo atenuado del virus de la gripe.
55. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, 49 ó 50, en la que el genoma del virus com-  
prende al menos un segmento obtenido de un virus diferente.
- 45 56. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, 49, ó 50, en la que el virus de la gripe atenuado  
está manipulado para codificar un antígeno extraño.
57. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, 49 ó 50, en la que el virus de la gripe atenuado  
50 está manipulado para codificar un antígeno tumoral.
58. La línea celular deficiente en interferón de la reivindicación 48, 49 ó 50, en la que el virus de la gripe atenuado  
está manipulado para codificar un epítipo obtenido de otro virus.

55

60

65

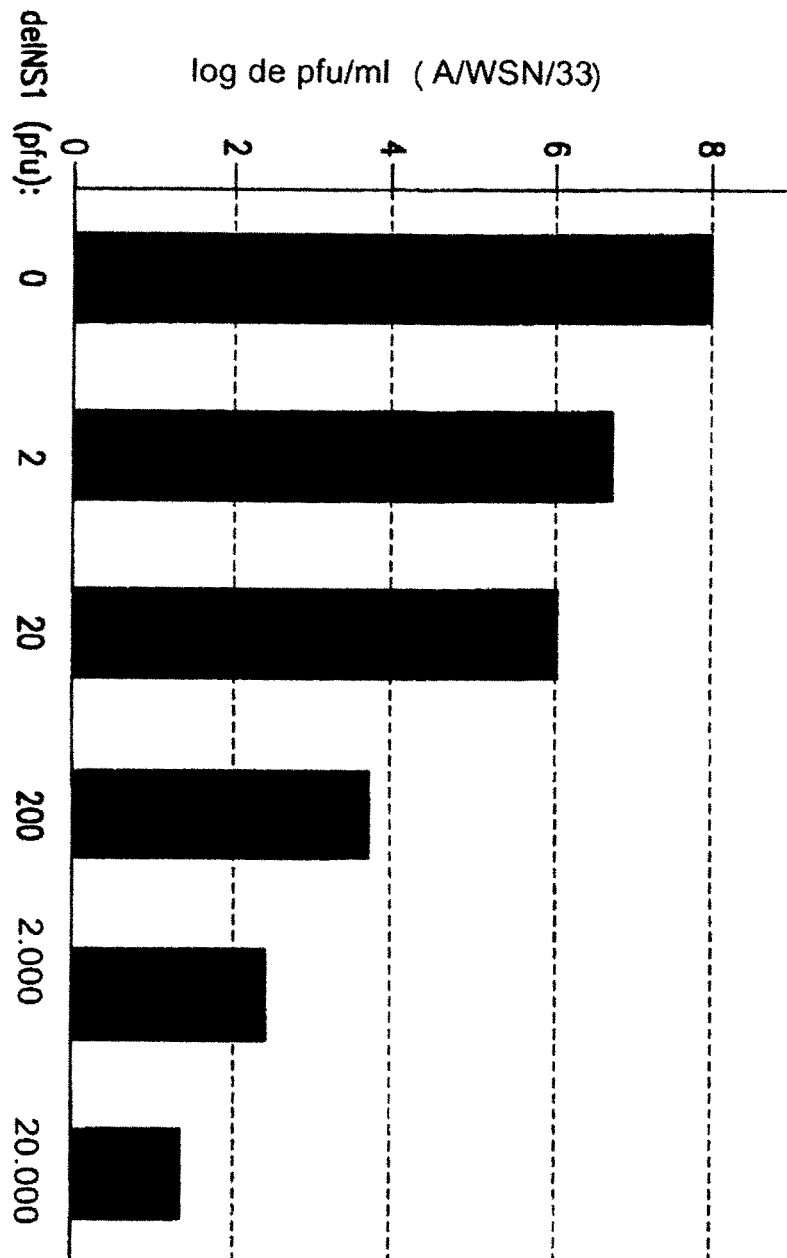


FIG.1

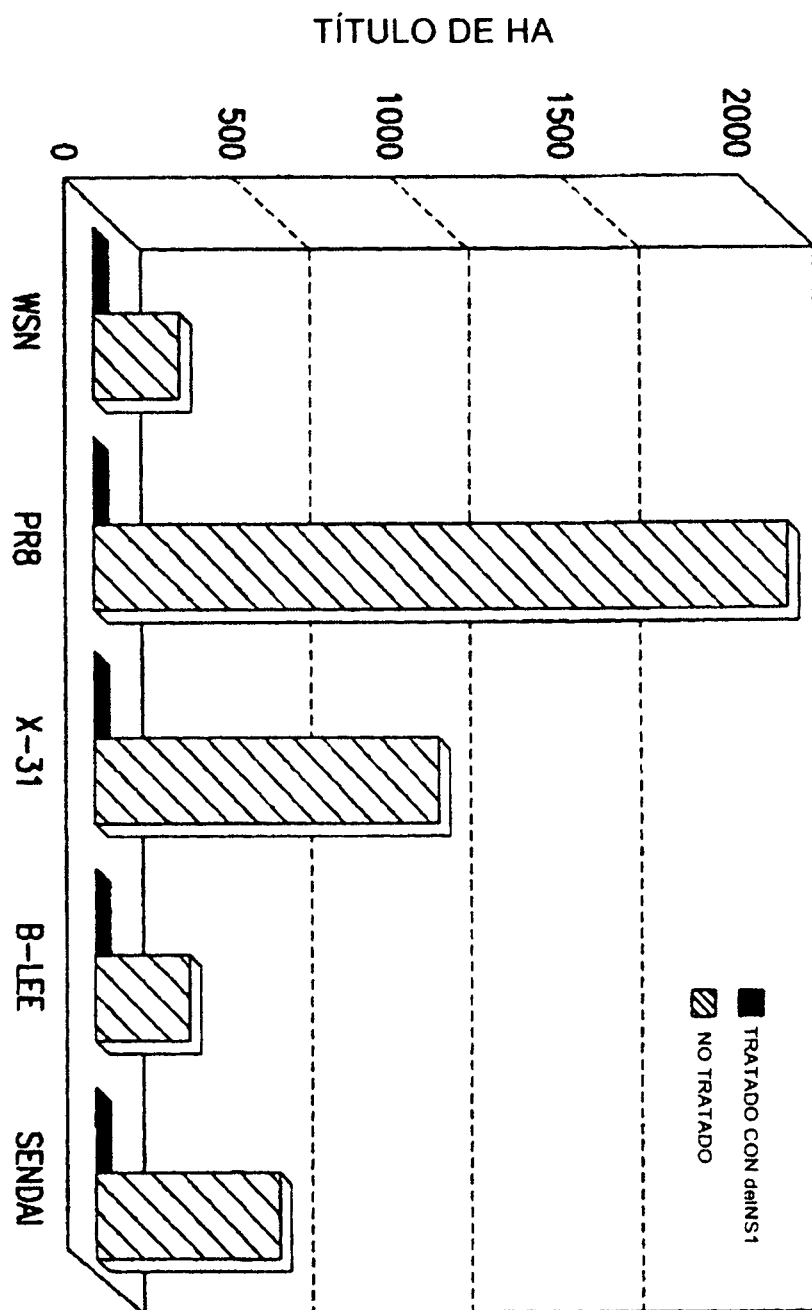


FIG.2

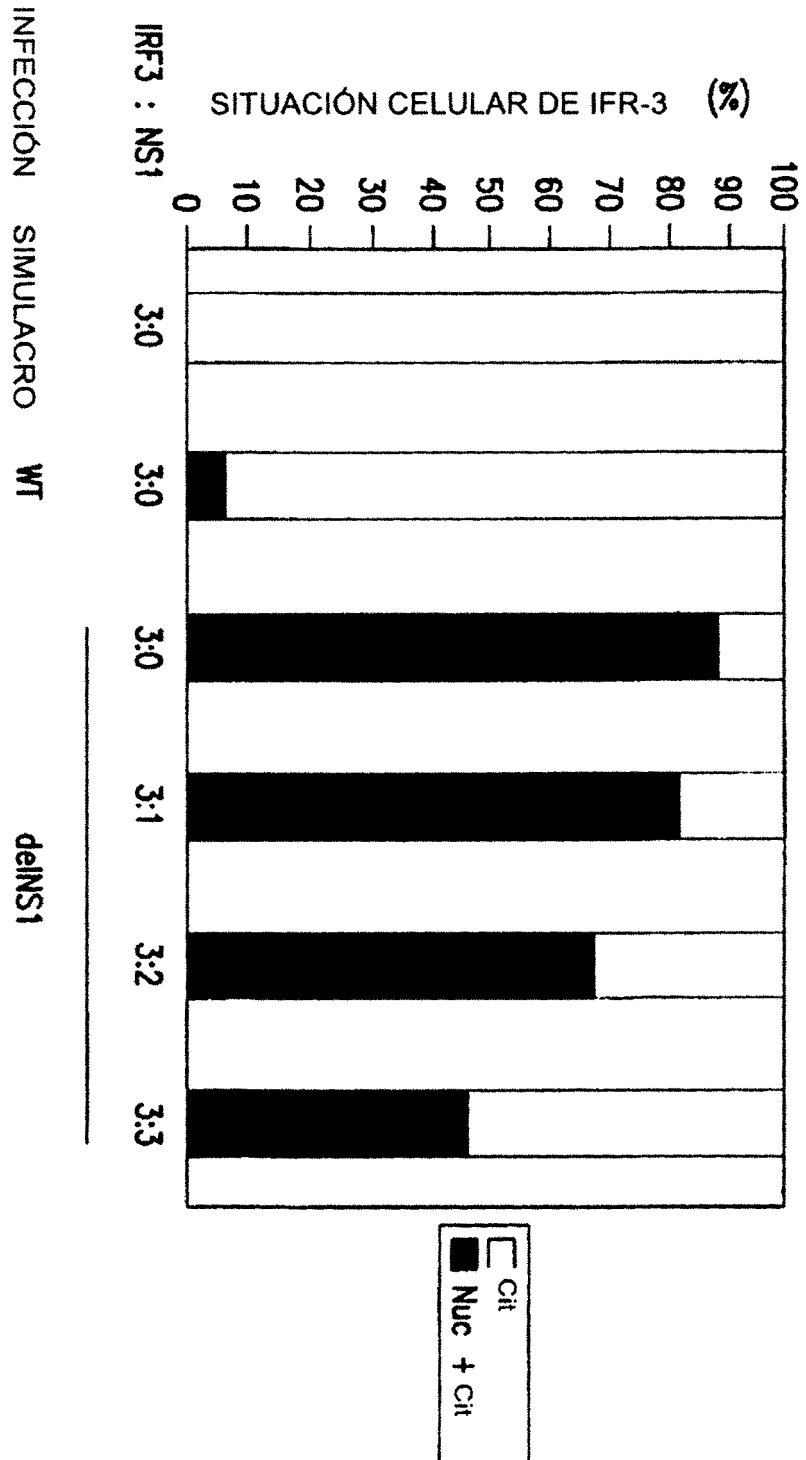


FIG.3