

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 021**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04786052 .3**
96 Fecha de presentación: **09.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1644037**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Partículas funcionales similares al virus (VLP) de la gripe**

30 Prioridad:
11.07.2003 US 617569

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

73 Titular/es:
NOVAVAX, INC.
8320 GUILFORD ROAD, SUITE C
COLUMBIA, MD 21046, US

72 Inventor/es:
ROBINSON, Robin, A. y
PUSHKO, Peter, M.

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 380 021 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

Partículas funcionales similares al virus (VLP) de la gripe

5 **Antecedentes de la invención**

[0001] El virus de la gripe es un miembro de la familia *Orthomyxoviridae* (para una revisión, véase Murphy y Webster, 1996). Existen tres subtipos de virus de la gripe denominados A, B y C. El virión de la gripe contiene un genoma de ARN fragmentado, de sentido negativo. El virión de la gripe incluye las siguientes proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), proteína de matriz (M1), canal iónico que permite el paso de protones (M2), nucleoproteína (NP), proteína básica de la polimerasa 1 (PB1), proteína básica de la polimerasa 2 (PB2), proteína ácida de la polimerasa (PA) y proteína no estructural 2 (NS2). Las proteínas HA, NA, M1 y M2 están asociadas a la membrana, mientras que las proteínas NP, PB1, PB2, PA y NS2 son proteínas asociadas a la nucleocápside. La NS1 es la única proteína no estructural no asociada a las partículas de virión, sino que es específica de las células infectadas por el virus de la gripe. La proteína M1 es la proteína más abundante en las partículas de virus de la gripe. Las proteínas HA y NA son glucoproteínas de la envoltura y son las responsables de la unión del virus y de la penetración de las partículas víricas en la célula y son la fuente de los principales epítomos inmunodominantes para la neutralización del virus y la inmunidad protectora. Ambas proteínas, la HA y la NA, se consideran los componentes más importantes de las vacunas antigripales profilácticas.

[0002] La infección por el virus de la gripe se inicia con la fijación de la proteína de superficie HA del virión a un receptor celular que contiene ácido siálico (glucoproteínas y glucolípidos). La proteína NA media el procesamiento del receptor de ácido siálico y la penetración del virus en la célula depende de la endocitosis mediada por el receptor dependiente de HA. En los confines ácidos de los endosomas internalizados que contiene un virión de la gripe, la proteína HA₂ sufre una serie de cambios conformacionales que provocan la fusión de las membranas viral y celular y la degradación de la cápside del virus y la liberación mediada por M2 de las proteínas M1 de las ribonucleoproteínas (RNP) asociadas a la nucleocápside, que migran hacia el núcleo celular para la síntesis de ARN viral. Los anticuerpos anti-proteínas HA impiden la infección por el virus neutralizando la infectividad del virus, mientras que los anticuerpos anti-proteínas NA actúan sobre las etapas iniciales de la replicación viral.

[0003] Las vacunas contra el virus de la gripe A y B inactivadas están aprobadas actualmente para administración parenteral. Estas vacunas trivalentes se producen en la cavidad alantoidea de huevos de pollo embrionados, se purifican por centrifugación diferencial o cromatografía en columna, se inactivan con formalina o β-propiolactona y se formulan como una mezcla de las dos cepas de la cepa de tipo A y tipo B de los virus de la gripe en circulación entre la población humana durante un año dado. Las vacunas antigripales disponibles en el mercado son vacunas víricas constituidas por el virus completo (WV) o el subvirión (SV; vacunas de virus fraccionados o con el antígeno de superficie purificado). La vacuna WV contiene viriones intactos inactivados. Las vacunas SV tratadas con disolventes, tales como tri-n-butilfosfato (Flu-Shield, Wyeth-Lederle) contienen casi todas las proteínas estructurales virales y algunas de la envuelta viral. Las vacunas SV solubilizadas con Triton X-100 (Fluzone, Connaught; Fluvirin, Evans) contienen agregados de monómeros de HA, NA y NP principalmente, aunque también hay cantidades residuales de otras proteínas estructurales virales. Una potencial vacuna con virus de la gripe vivos atenuados adaptados al frío (FluMist, MedImmune) ha obtenido recientemente la autorización de comercialización por la FDA para su uso comercial como vacuna de administración intranasal indicada para la inmunización activa y la prevención de la enfermedad causada por los virus de la gripe A y B en niños sanos y adolescentes de 5 a 17 años de edad y adultos sanos de 18 a 49 años de edad.

[0004] Se han desarrollado varios productos recombinantes como candidatos a vacuna antigripal recombinante. Estas estrategias se han centrado en la expresión, producción y purificación de las proteínas HA y NA del virus de la gripe de tipo A, incluida la expresión de estas proteínas utilizando células de insecto infectadas por baculovirus (Crawford *et al.*, 1999; Johansson, 1999; Treanor *et al.*, 1996), vectores virales (Pushko *et al.*, 1997; Berglund *et al.*, 1999) y construcciones de vacunas de ADN (Olsen *et al.*, 1997).

[0005] Crawford *et al.* (1999) demostraron que la HA del virus de la gripe expresada en células de insecto infectadas con baculovirus es capaz de prevenir la gripe letal causada por los subtipos del virus de la gripe aviar H5 y H7. Al mismo tiempo, otro grupo demostró que las proteínas HA y NA del virus de la gripe expresadas en baculovirus inducían respuestas inmunitarias en animales superiores a las inducidas por una vacuna convencional (Johansson *et al.*, 1999). Se comparó la inmunogenicidad y la eficacia de la hemaglutinina del virus de la gripe equina expresada en baculovirus con las de un candidato a vacuna de ADN homóloga (Olsen *et al.*, 1997). En conjunto, los datos demostraron que con las proteínas HA o NA recombinantes se puede conseguir un alto grado de protección frente a la exposición al virus de la gripe, utilizando diversos métodos experimentales y en diferentes modelos en animales.

[0006] Lakey *et al.* (1996) demostraron que una vacuna que contiene la proteína HA del virus de la gripe derivada de baculovirus se toleraba bien y era inmunogénica en voluntarios humanos en un estudio de Fase I de seguridad del aumento de la dosis. Sin embargo, los resultados de los estudios de Fase II realizados en diversos centros en voluntarios humanos vacunados con diferentes dosis de vacunas de la gripe que contenían proteínas HA y/o NA, indicaban que las vacunas con la proteína subunidad recombinante no provocaban inmunidad protectora [G. Smith, Protein Sciences; M. Perdue, USDA, Comunicaciones personales]. Estos resultados indicaban que los epítomos conformacionales

presentados en la superficie de los peplómeros de HA y NA de viriones infecciosos eran importantes para provocar la formación de anticuerpos neutralizantes y el desarrollo de inmunidad protectora.

5 **[0007]** En cuanto a la inclusión de otras proteínas del virus de la gripe en candidatos a vacunas antigripales recombinantes, se han llevado a cabo varios estudios, como los experimentos con la nucleoproteína del virus de la gripe, NP, sola o en combinación con la proteína M1 (Ulmer *et al.*, 1993; Ulmer *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1995; Tsui *et al.*, 1998). Estos candidatos a vacunas, que estaban compuestos por proteínas internas del virión apenas modificadas, provocaban una inmunidad de amplio espectro que era principalmente celular (linfocitos T de memoria tanto CD4+ como CD8+).
10 Estos experimentos implicaban el uso de los vectores genéticos de ADN o virales. Se necesitaron cantidades relativamente elevadas de ADN inyectado, ya que los resultados de los experimentos con dosis más bajas de ADN indicaban bajos niveles o ausencia de protección (Chen *et al.*, 1998). Por lo tanto, puede ser necesario realizar más estudios preclínicos y clínicos para evaluar si dichas estrategias basadas en el ADN que implicaban la NP y la M1 del virus de la gripe son seguras, eficaces y persistentes.

15 **[0008]** Recientemente, en un intento por desarrollar vacunas antigripales más eficaces, se han utilizando partículas de proteínas como vehículos de los epítomos de la proteína M2 del virus de la gripe. El desarrollo de una vacuna basada en M2 estaba justificado porque en estudios en animales, las proteínas M2 provocaban inmunidad protectora frente al virus de la gripe (Slepishkin *et al.*, 1995). Neiryneck *et al.* (1999) utilizaron un dominio transmembrana M2 de 23 aa de longitud como pareja de fusión amino terminal con el antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B (HBcAg) para exponer el
20 epítomo(s) de M2 de la superficie de las partículas pseudocápside del HbcAg. Sin embargo, a pesar del hecho de que tanto la proteína M2 de longitud completa como la VLP M2-HBcAg inducían anticuerpos detectables y protección en ratones, era improbable que las futuras vacunas antigripales se basaran exclusivamente en la proteína M2, ya que la proteína M2 estaba presente en un número bajo de copias por virión, mostraba una antigenicidad débil, era incapaz de provocar la formación de anticuerpos capaces de unirse a viriones de la gripe libres y era incapaz de bloquear la unión del virus a los receptores de la célula (es decir, la neutralización del virus).
25

[0009] Dado que las investigaciones anteriores han demostrado que las glucoproteínas de superficie del virus de la gripe, HA y NA, son las principales dianas para que se desencadene la inmunidad protectora frente al virus de la gripe y que M1 representa una diana conservada para la inmunidad celular frente a la gripe, una nueva vacuna candidata puede incluir estos antígenos virales como una partícula proteica macromolecular, tales como las partículas similares al virus (VLP). Además, la partícula con estos antígenos del virus de la gripe puede presentar epítomos conformacionales que provocan la formación de anticuerpos neutralizantes frente a múltiples cepas de los virus de la gripe.
30

[0010] Varios estudios han demostrado que las proteínas recombinantes del virus de la gripe podrían autoensamblarse en VLP en cultivos celulares utilizando plásmidos de expresión en mamíferos o vectores baculovirus.
35

[0011] (Gomez-Puertas *et al.*, 1999; Gomez-Puertas *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2000; Latham y Galarza, 2001). Gomez-Puertas *et al.* (1999) demostraron que la formación eficaz de VLP de la gripe depende de los niveles de expresión de las proteínas virales. Gomez-Puertas *et al.*, 2000 examinaron la generación de VLP en células COS-1 y refirieron que la proteína M1, cuando se expresa sola, se ensambla en partículas de gemación similares a las del virus. Neumann *et al.* (2000) establecieron un sistema basado en plásmidos de expresión en mamíferos para la generación de partículas similares al virus de la gripe infecciosas formadas totalmente a partir de ADNc clonados. Latham y Galarza (2001) describieron la formación de VLP de la gripe en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan conjuntamente los genes HA, NA, M1 y M2. Véase también el documento WO02/00885. Estos estudios han
40 demostrado que las proteínas del virión de la gripe pueden autoensamblarse tras la coexpresión en células eucariotas.
45

Descripción resumida de la invención

[0012] La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una VLP derivada del virus de la gripe, comprendiendo el procedimiento:
50

- a) la construcción de una construcción de baculovirus recombinante que codifica un grupo de proteínas estructurales del virus de la gripe, consistiendo dicho grupo en M1, HA y NA;
- b) la transfección, infección o transformación de una célula hospedadora adecuada con dicho baculovirus recombinante y el cultivo de la célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de M1, HA y NA;
- c) la formación de una VLP en dicha célula hospedadora, en donde las proteínas estructurales del virus de la gripe de dicha VLP consisten en M1, HA y NA;
- d) la cosecha de los medios celulares infectados que contienen la VLP de la gripe funcional y
- e) la purificación de la VLP.

[0013] La presente invención proporciona además una VLP o una composición que comprende una VLP obtenible mediante este procedimiento. La invención se refiere además a dicha VLP o composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de la gripe en un vertebrado o para proporcionar una respuesta inmunitaria protectora frente a la gripe en un vertebrado.
60
65

[0014] También se describen en la presente memoria estructuras proteicas macromoleculares que comprenden

secuencias que codifican las proteínas HA (N° de acceso GenBank AJ404626), NA (N° de acceso GenBank AJ404629), M1 (N° de acceso GenBank AJ278646), M2 (N° de acceso GenBank AF255363) y NP (N° de acceso GenBank AF255742) del virus de la gripe aviar de tipo A H9N2 y que comprenden secuencias que codifican las proteínas HA (N° de acceso GenBank AJ311466) y la NA (N° de acceso GenBank AJ291403) del virus de la gripe aviar de tipo A H3N2. El ARN genómico que codifica para estos genes virales de la gripe se pueden aislar de los aislados del virus de la gripe o de tejidos de organismos infectados con el virus de la gripe. Cada una de estas secuencias codificantes de la misma o de diferentes cepas o tipos del virus de la gripe se clonan cadena abajo de promotores transcripcionales en vectores de expresión y se expresan en células.

[0015] También se describe aquí una estructura proteica macromolecular que contiene (a) una primera proteína M1 del virus de la gripe y (b) una proteína estructural adicional, que puede incluir una segunda o más proteínas M1 del virus de la gripe; una primera, segunda o más proteínas HA del virus de la gripe; una primera, segunda o más proteínas NA del virus de la gripe y una primera, segunda o más proteínas M2 del virus de la gripe. Si la proteína estructural adicional no es una segunda o más proteínas M1 del virus de la gripe, entonces se incluyen ambos o todos los miembros del grupo, por ej., una primera y segunda proteínas M2 del virus de la gripe. Como tal, se proporciona una estructura proteica funcional del virus de la gripe, incluida una partícula subviral, VLP o estructura de capsómero o una parte del mismo, una vacuna, una vacuna multivalente y mezclas de las mismas que consisten esencialmente en proteínas estructurales del virus de la gripe producidas mediante el procedimiento de la invención. La estructura proteica macromolecular del virus de la gripe puede incluir las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe que son los productos de expresión de los genes del virus de la gripe clonados como fragmentos sintéticos de un virus de tipo silvestre.

[0016] La estructura proteica macromolecular también puede incluir una proteína estructural adicional, por ejemplo, una nucleoproteína (NP), proteínas de membrana de especies distintas a los virus de la gripe y una proteína de membrana de origen distinto al virus de la gripe, las cuales derivan de las aves o de mamíferos y diferentes subtipos del virus de la gripe, incluidos los virus de la gripe de subtipo A y B. La estructura puede incluir una estructura proteica macromolecular quimérica, la cual incluye una parte de al menos una proteína que tiene una fracción no producida por el virus de la gripe.

[0017] La prevención de la gripe puede realizarse proporcionando una estructura proteica macromolecular que puede autoensamblarse en una célula hospedadora a partir de una construcción recombinante. La estructura proteica macromolecular de la invención tiene la capacidad de autoensamblarse en partículas similares al virus (VLP) homotípicas o heterotípicas que presentan epítopos conformacionales de las proteínas HA y NA, los cuales provocan la formación de anticuerpos neutralizantes que son protectores. La composición puede ser una composición de vacuna, la cual también contiene un vehículo o diluyente y/o un adyuvante. Las VLP funcionales de la gripe provocan la formación de anticuerpos neutralizantes contra una o más cepas o tipos del virus de la gripe dependiendo de si las VLP de la gripe funcionales contienen proteínas HA y/o NA procedentes de una o más cepas o tipos virales. La vacuna puede incluir proteínas del virus de la gripe que son proteínas del virus de la gripe de tipo silvestre. Preferiblemente, las proteínas estructurales que contienen la VLP de la gripe, o una parte de la misma, pueden derivar de las diferentes cepas de los virus de la gripe de tipo silvestre. Las vacunas antigripales pueden administrarse a seres humanos o animales para provocar una inmunidad protectora frente a una o más cepas o tipos del virus de la gripe.

[0018] Las estructuras proteicas macromoleculares de la invención pueden presentar actividad hemaglutinina y/o actividad neuraminidasa.

[0019] Como se ha descrito anteriormente, en algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento para la producción de una VLP derivada del virus de la gripe mediante la construcción de una construcción recombinante que codifica los genes estructurales M1, HA y NA del virus de la gripe. Se utiliza una construcción recombinante para transfectar, infectar o transformar una célula hospedadora adecuada con el baculovirus recombinante. La célula hospedadora se cultiva en condiciones que permiten la expresión de M1, HA y NA y se forma la VLP en la célula hospedadora. Los medios celulares infectados que contienen VLP de la gripe funcional se cosechan y se purifica la VLP. La invención puede incluir también una etapa adicional de co-transfección, co-infección o co-transformación de la célula hospedadora con una segunda construcción recombinante que codifica una segunda proteína de la gripe, incorporando de esta manera la segunda proteína del virus de la gripe en la VLP. Dichas proteínas estructurales pueden derivar del virus de la gripe, incluidas NA, M2 y NP y al menos una proteína estructural deriva de las aves o de mamíferos. La proteína estructural puede ser de un virus de la gripe de subtipo A y B. De acuerdo con la invención, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota. Además, la VLP puede ser una VLP quimérica.

[0020] La invención también incluye un procedimiento para la formulación de un principio activo que contiene una VLP de la gripe, introduciendo construcciones recombinantes que codifican genes virales de la gripe en células hospedadoras y permitiendo el autoensamblaje de las proteínas del virus de la gripe recombinantes en una VLP homotípica o heterotípica funcional en células, como se ha descrito anteriormente. La VLP de la gripe se aísla y se purifica y se formula un principio activo que contiene la VLP de la gripe. El principio activo puede incluir además un adyuvante. Además, la invención proporciona un procedimiento para formular un fármaco, mezclando dicho principio activo que contiene una VLP de la gripe con una vesícula lipídica, esto es, una vesícula lipídica no iónica. Por lo tanto, las VLP homotípicas o heterotípicas funcionales pueden sufrir gemación en forma de partículas envueltas desde las células infectadas. Las VLP de la gripe gemadas se pueden aislar y purificar mediante ultracentrifugación o cromatografía en columna como principios activos y formularse solas o con adyuvantes, tales como Novasomesg[®], un producto de Novavax, Inc., como fármacos, tales como

vacunas. Novasomes[®], que proporcionan un efecto inmunológico aumentado, se describen además en la patente de Estados Unidos N° 4.911.928

5 **[0021]** La invención proporciona la VLP o composición para su uso en un método de tratamiento, prevención o generación de una respuesta inmunitaria protectora.

10 **[0022]** Como se describe en la presente memoria el principio activo VLP de la gripe se puede formular como reactivos de laboratorio usados para estudios de la estructura del virus de la gripe y ensayos para diagnóstico clínico. La solicitud también describe un kit para el tratamiento del virus de la gripe mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición de la invención y las instrucciones de uso.

Breve descripción de los dibujos

15 **[0023]**

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la neuraminidasa (NA) del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEC ID N°: 1).

20 La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEC ID N°: 2).

La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de matriz M1 (M1) del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEC ID N°: 3).

25 La Figura 4 muestra los vectores de transferencia para la construcción de baculovirus recombinantes para la expresión de las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). La Figura 4A muestra un vector de transferencia para la expresión de genes individuales y la Figura 4B muestra el vector de transferencia para la multiexpresión de los genes.

30 La Figura 5 muestra la expresión de las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en células Sf-95.

35 La Figura 6 muestra la purificación de las VLP del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) mediante el método del gradiente de densidad en sacarosa.

La Figura 7 muestra la detección de la proteína del virus de la gripe mediante cromatografía de filtración en gel. Los anticuerpos utilizados en los análisis de transferencia de Western son los siguientes: (A) anti-H9N2 de conejo; (b) mAb anti-M1 murino y (C) anti-BACgp64 murino.

40 La Figura 8 muestra la detección de las proteínas del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), incluidas las partículas subvirales, VLP y complejos de VLP, mediante microscopía electrónica.

La Figura 9 muestra la actividad de hemaglutinación de las VLP del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) purificadas.

45 La Figura 10 muestra la actividad neuraminidasa de las VLP del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) purificadas.

50 La Figura 11 muestra el programa de inmunización y extracción de sangre para el estudio de inmunogenicidad del virus de la gripe recombinante con VLP del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) purificadas en ratones.

La Figura 12 muestra los resultados de un estudio de inmunogenicidad en ratones inmunizados con VLP recombinantes del virus de la gripe H9N2.

55 La Figura 12A muestra los sueros de ratones BALB/c inmunizados con VLP recombinantes constituidas por proteínas HA, NA y M1 procedentes del virus de la gripe aviar de tipo A/H9N2/Hong Kong/1073/99. La Figura 12B muestra los sueros de conejos New Zealand blancos inmunizados con el virus de la gripe aviar de tipo A H9N2 que se hicieron reaccionar con las transferencias de Western que contenían virus de la gripe aviar de tipo A H9N2 inactivados (columnas 1 y 3) o virus de la gripe aviar de tipo H9N2 adaptados al frío (columnas 2 y 4).

60

Descripción detallada de la invención

5 [0024] Como se usa en la presente memoria, el término "baculovirus", también conocido como baculoviridae, se refiere a una familia de virus de ADN con envoltura de artrópodos, cuyos miembros se pueden usar como vectores de expresión para producir proteínas recombinantes en cultivos celulares con inserto. El virión contiene una o más nucleocápsides en forma de bacilo que contienen moléculas de ADN bicatenario circular superenrollado (M_r 54 x 10⁶ - 154 x 10⁶). El virus usado como vector es generalmente el virus de la poliedrosis nuclear (NVP) de *Autographa californica*. La expresión de los genes introducidos está bajo el control del potente promotor que normalmente regula la expresión del componente proteico poliedrina de la inclusión nuclear de gran tamaño en la que los virus se encuentran embebidos en las células infectadas.

15 [0025] Como se usa en la presente memoria, el término "derivada de" se refiere al origen o fuente y puede incluir cualquier molécula existente en la naturaleza, recombinante, no purificada o purificada. Las proteínas y las moléculas de la presente invención pueden derivar de moléculas del virus de la gripe o de moléculas distintas a las del virus de la gripe.

20 [0026] Como se usa en la presente memoria, el término "primera" proteína del virus de la gripe, es decir, una primera proteína M1 del virus de la gripe, se refiere a una proteína, tal como M1, HA, NA y M2, derivada de una cepa particular del virus de la gripe. La cepa o tipo del primer virus de la gripe difiere de la cepa o tipo de la segunda proteína del virus de la gripe. Por lo tanto, "segunda" proteína del virus de la gripe, es decir, la segunda proteína M1 del virus de la gripe, se refiere a una proteína, tal como M1, HA, NA y M2, derivada de una segunda cepa del virus de la gripe que es un cepa o tipo diferente de la primera proteína del virus de la gripe.

25 [0027] Como se usa en la presente memoria, el término "actividad hemaglutinina" se refiere a la capacidad de las proteínas que contienen HA, VLP o partes de las mismas para unirse y aglutinar los glóbulos rojos (eritrocitos).

30 [0028] Como se usa en la presente memoria, la expresión "actividad neuraminidasa" se refiere a la actividad enzimática de las proteínas que contienen NA, VLP o partes de las mismas que las contienen para escindir restos de ácido siálico de sustratos, incluidas proteínas, tales como la fetuina.

[0029] Como se usa en la presente memoria, el término "heterotípico" se refiere a uno o más tipos o cepas diferentes de virus.

[0030] Como se usa en la presente memoria, el término "homotípico" se refiere a un tipo o cepa de virus.

35 [0031] Como se usa en la presente memoria, el término "estructura proteica macromolecular" se refiere a la construcción o disposición de una o más proteínas.

[0032] Como se usa en la presente memoria, el término vacuna "multivalente" se refiere a una vacuna contra múltiples tipos o cepas del virus de la gripe.

40 [0033] Como se usa en la presente memoria, la expresión "distinto al virus de la gripe" se refiere a una proteína o molécula que no deriva del virus de la gripe.

45 [0034] Como se usa en la presente memoria, el término "vacuna" se refiere a una preparación de patógenos muertos o atenuados, o de determinantes antigénicos derivados, que se usan para inducir la formación de anticuerpos o de inmunidad contra el patógeno. Una vacuna ofrecida para proporcionar inmunidad frente a la enfermedad, por ejemplo, la gripe, que está causada por los virus de la gripe. La presente invención proporciona composiciones de vacuna que son inmunogénicas y proporcionan protección.

50 [0035] La gripe sigue siendo un problema de salud pública omnipresente a pesar de la existencia de vacunas con virus inactivados específicas que son 60-80% eficaces en condiciones óptimas. Cuando estas vacunas son eficaces, habitualmente se evita la enfermedad gracias a la prevención de la infección vírica. La falta de respuesta a la vacuna puede producirse como resultado de diferencias antigénicas acumuladas (desviación antigénica y deriva antigénica). Por ejemplo, el virus de la gripe aviar de tipo A H9N2 ha circulado conjuntamente con el virus de la gripe humana de tipo A Sydney/ 97 H3N2 en cerdos y ha conducido a una redistribución genética y a la aparición de nuevas cepas del virus de la gripe humana con potencial pandémico (Peiris *et al.*, 2001). En el caso de una desviación antigénica de este tipo, es improbable que las vacunas actuales pudieran proporcionar una protección adecuada.

60 [0036] Otro motivo de la escasez de programas de vacunación antigripal es la persistencia relativamente breve de la inmunidad provocada por las vacunas actuales. Además, la insuficiencia de las medidas de control antigripal refleja el uso limitado de las vacunas actuales debido a la reactogenicidad de la vacuna y a los efectos secundarios en niños pequeños, ancianos y personas con alergias a los componentes del huevo que se usan en la fabricación de las vacunas antigripales con virus inactivados comercializadas.

65 [0037] Además, las vacunas con virus de la gripe inactivados frecuentemente carecen de o contienen epítopos conformacionales de HA y NA alterados, los cuales provocan la formación de anticuerpos neutralizantes y juegan un

papel importante en la protección frente a la enfermedad. Por lo tanto, las vacunas virales inactivadas, así como algunas vacunas con subunidades proteicas monoméricas del virus de la gripe recombinantes ofrecen una protección inadecuada. Por otro lado, las estructuras proteicas macromoleculares, tales como capsómeros, partículas subvirales y/o VLP, incluyen múltiples copias de las proteínas nativas que presentan epítomos conformacionales que son ventajosos para una inmunogenicidad óptima de la vacuna.

[0038] La presente solicitud describe la clonación de los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en un único vector de expresión baculovirus solo o en tándem y la producción de vacunas antigripales candidatas o compuestas por proteínas estructurales del virus de la gripe recombinantes que se autoensamblan en estructuras proteicas macromoleculares homotípicas funcionales e inmunogénicas, incluidas partículas subvirales del virus de la gripe y VLP de la gripe en células de insecto infectadas con baculovirus.

[0039] La presente solicitud también incluye la clonación de los genes HA, NA, M1, M2 y NP del virus de la gripe humana A/Sydney/5/94 (H3N2) en vectores de expresión baculovirus y la producción de vacunas antigripales candidatas o reactivos compuestos por proteínas estructurales del virus de la gripe que se autoensamblan en estructuras proteicas macromoleculares homotípicas funcionales e inmunogénicas, incluidas partículas subvirales del virus de la gripe y VLP de la gripe en células de insecto infectadas con baculovirus.

[0040] Además, la presente solicitud describe la clonación del gen HA del virus de la gripe humana A/Sydney/5/94 (H3N2) y de los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en un único vector de expresión baculovirus en tándem y la producción de vacunas antigripales candidatas o reactivos compuestos por proteínas estructurales del virus de la gripe que se autoensamblan en estructuras proteicas macromoleculares heterotípicas funcionales e inmunogénicas, incluidas partículas subvirales del virus de la gripe y VLP de la gripe en células de insecto infectadas con baculovirus.

[0041] Esta invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse como limitativos.

EJEMPLOS ESPECÍFICOS

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

[0042] Se expresaron los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en células de *Spodoptera frugiperda* (línea celular Sf-9S; ATCC PTA-4047) utilizando el sistema de expresión baculovirus bacmid. Los genes HA, NA y M1 se sintetizaron mediante transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ARN aislado del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Figuras 1, 2 y 3). Para la transcripción inversa y la PCR, se utilizaron cebadores de oligonucleótidos específicos de los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Tabla 1). Las copias de ADNc de estos genes se clonaron inicialmente en el vector de subclonación bacteriano, pCR2.1TOP0. A partir de los tres plásmidos basados en pCR2.1TOPO resultantes, se insertaron los genes HA, NA y M1 cadena abajo de los promotores de la poliedrina AcMNPV en el vector de transferencia baculovirus, pFastBac1 (InVitrogen), dando lugar a tres plásmidos basados en pFastBac1: pHA, pNA y pM1 que expresan estos genes del virus de la gripe, respectivamente. A continuación, se construyó un único plásmido basado en pFastBac1, pHAM, que codifica los genes tanto HA como M1, cada uno de ellos cadena abajo de un promotor diferente de la poliedrina (Figura 4). Se determinó la secuencia de nucleótidos del gen NA con las regiones 5' y 3' adyacentes en el plásmido pNA (SEC ID N° 1) (Figura 1). Al mismo tiempo, también se determinaron las secuencias de nucleótidos de los genes HA y M1 con las regiones adyacentes utilizando el plásmido pHAM (SEC ID N° 2 y 3) (Figuras 2 y 3).

[0043] Por último, se clonó un fragmento de ADN de restricción del plásmido pHAM que codificaba los casetes de expresión tanto de HA como de M1 en el plásmido pNA. Esto dio lugar al plásmido pNAHAM que codifica los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Figura 4).

[0044] Se usó el plásmido pNAHAM para construir un baculovirus recombinante que contuviera los genes NA, HA y M1 del virus de la gripe integrados en el genoma, cada uno corriente abajo de un promotor diferente de la poliedrina del baculovirus. La infección de células de insecto Sf-9S permisivas con los baculovirus recombinantes resultantes dio lugar a la co-expresión de estos tres genes del virus de la gripe en cada célula Sf-9S infectada con dichos baculovirus recombinantes.

Resultados

[0045] Los productos de expresión en células Sf-9S infectadas se caracterizaron 72 horas postinfección (p.i.) mediante análisis SDS-PAGE, tinción de proteínas con azul Coomassie y análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos anti-HA y anti-M1 (Figura 5). El análisis de inmunotransferencia de Western se llevó a cabo utilizando anticuerpos de conejo anti-virus de la gripe tipo A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (CDC, Atlanta, Georgia, Estados Unidos) o anticuerpos monoclonales de ratón anti-proteína M1 del virus de la gripe (Serotec, Reino Unido). Las proteínas HA, NA y M1 de los pesos moleculares esperados (64 kd, 60 kd y 31 kd, respectivamente) se detectaron mediante

- análisis de inmunotransferencia de Western. En comparación con la cantidad de proteína HA detectada en este ensayo, la proteína NA mostraba una menor reactividad con el suero de conejo frente al virus de la gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Las posibles explicaciones para la cantidad de proteína NA detectable incluían unos menores niveles de expresión de la proteína NA de células Sf-9S infectadas con el baculovirus recombinante en comparación con la proteína HA, una menor reactividad de la NA con este suero en condiciones desnaturalizantes en el ensayo de inmunotransferencia de Western (debido a la eliminación de epítomos de la NA importantes durante la electroforesis en gel responsables de la unión a la membrana), menor avidéz del anticuerpo anti-NA en comparación con el anticuerpo anti-HA o una menor abundancia de anticuerpos anti-NA en el suero.
- 5
- 10 **[0046]** El medio de cultivo de las células Sf-9S infectadas con baculovirus recombinantes que expresan las proteínas HA, NA y M1 del virus A/Hong Kong/ 1073/99 (H9N2) también se analizó para detectar la presencia de proteínas del virus de la gripe. Los sobrenadantes clarificados del cultivo se sometieron a ultracentrifugación a 27.000 rpm con el fin de concentrar los complejos de proteínas de alto peso molecular del virus de la gripe, tales como las partículas subvirales, VLP, complejos de VLP y, posiblemente, otras partículas autoensambladas constituidas por las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe. Los productos proteicos sedimentados se suspendieron de nuevo en solución salina con tampón fosfato (PBS, pH 7,2) y se purificaron de nuevo mediante ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa al 20-60%. Se recogieron fracciones de los gradientes de sacarosa y se analizaron mediante análisis SDS-PAGE, análisis de inmunotransferencia de Western y microscopía electrónica.
- 15
- 20 **[0047]** Las proteínas HA y M1 del virus de la gripe de los pesos moleculares esperados se detectaron en múltiples fracciones de gradiente de densidad de sacarosa mediante tinción con azul de Coomassie y análisis de inmunotransferencia de Western (Figura 6). Esto sugería que las proteínas del virus de la gripe procedentes de células Sf-9S infectadas se agregaban en complejos de alto peso molecular, tales como capsómeros, partículas subvirales, VLP y/o complejos de VLP. Las proteínas NA, aunque no se detectaban sistemáticamente mediante tinción con azul de Coomassie y análisis de inmunotransferencia de Western, posiblemente debido a la incapacidad del suero de conejo antigripal de reconocer la proteína NA desnaturalizada en el ensayo de inmunotransferencia de Western, se detectaban sistemáticamente en el ensayo de actividad enzimática de la neuraminidasa (Figura 10).
- 25
- 30 **[0048]** La presencia de las VLP de alto peso molecular se confirmó mediante cromatografía de filtración en gel. Se cargó una alícuota de las fracciones de gradiente de densidad de sacarosa que contenía proteínas del virus de la gripe en una columna de Sepharose CL-4B para fraccionamiento en función de la masa. La columna se calibró con Azul dextrano 2000, Amarillo dextrano y vitamina B12 (Amersham Pharmacia) con pesos moleculares aparentes de 2.000.000, 20.000 y 1.357 dalton, respectivamente, y se determinó el volumen hueco de la columna. Como se esperaba, las proteínas del virus de la gripe de alto peso molecular migraron hacia el volumen hueco de la columna, el cual era característico de las proteínas macromoleculares, tales como las partículas virales. Las fracciones se analizaron mediante análisis de inmunotransferencia de Western para detectar las proteínas del virus de la gripe y del baculovirus. Por ejemplo, las proteínas M1 se detectaron en las fracciones del volumen hueco, las cuales también contenían proteínas de baculovirus (Figura 7).
- 35
- 40 **[0049]** La morfología de las VLP y de las proteínas del virus de la gripe de las fracciones de gradiente de sacarosa se elucidó mediante microscopía electrónica. Para la microscopía electrónica con tinción negativa, las proteínas del virus de la gripe de las dos fracciones de gradiente de densidad de sacarosa se fijaron en glutaraldehído al 2% en PBS, pH 7,2. El examen mediante microscopía electrónica de muestras teñidas negativamente reveló la presencia de complejos proteicos macromoleculares o VLP en ambas fracciones. Estas VLP presentaban diferentes tamaños, incluidos diámetros de aproximadamente 60 y 80 nm, y morfologías (esferas). También se detectaron complejos más grandes de ambos tipos de partículas, así como partículas en forma de bastoncillo (Figura 8). Todas las estructuras macromoleculares observadas tenían espículas (peplómeros) en sus superficies, las cuales son características de los virus de la gripe. Dado que el tamaño y el aspecto de las partículas de 80 nm eran similares al de las partículas del virus de la gripe de tipo silvestre, estas estructuras probablemente representaban VLP que tenían distintas similitudes a los viriones de la gripe de tipo silvestre, incluida la geometría, arquitectura, número de triangulación, simetría de la partícula y otras características similares. Las partículas más pequeñas de aproximadamente 60 nm pueden representar partículas subvirales que difieren de las VLP tanto morfológicamente como estructuralmente. También se ha observado un fenómeno similar de proteínas macromoleculares recombinantes de diferentes tamaños y morfologías en otros virus. Por ejemplo, el antígeno del núcleo (HBcAg) recombinante del virus de la hepatitis B forma partículas de diferentes tamaños, que tienen diferente arquitectura y número de triangulación $T=4$ y $T=3$, respectivamente (Crowther *et al.*, 1994).
- 45
- 50
- 55
- 60 **[0050]** Para caracterizar las propiedades funcionales de las VLP del virus de la gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) purificadas, se analizaron las muestras mediante un ensayo de hemaglutinación (Figura 9) y un ensayo de actividad enzimática de la neuraminidasa (Figura 10). Para el ensayo de hemaglutinación, se mezclaron diluciones 1/2 de VLP de la gripe purificadas con eritrocitos de cobaya 0,6% y se incubaron a 4°C durante 1 h o 16 h. Se inspeccionó visualmente el grado de hemaglutinación y se determinó y registró la dilución más alta de proteínas recombinantes del virus de la gripe capaces de aglutinar eritrocitos (Figura 9). De nuevo, muchas de las fracciones del gradiente de densidad de sacarosa presentaban actividad de hemaglutinación, lo que sugiere que había presentes múltiples formas macromoleculares y monoméricas de las proteínas del virus de la gripe. El título más alto detectado fue 1:4000. En un experimento de control, el virus de la gripe A/Shangdong de tipo silvestre mostró un título de 1:2000. El ensayo de hemaglutinación reveló que las VLP recombinantes constituidas por las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe
- 65

A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) eran funcionalmente activas. Esto sugería que el ensamblaje, conformación y plegado de las proteínas subunidad HA de las VLP eran similares o idénticos a los del virus de la gripe de tipo silvestre.

5 **[0051]** Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática de la neuraminidasa en las muestras de VLP H9N2 purificadas. La cantidad de actividad neuraminidasa en las fracciones de gradiente de densidad de sacarosa se determinó utilizando fetuina como sustrato. En el ensayo de actividad enzimática de la neuraminidasa, la neuraminidasa escindió el ácido siálico de las moléculas del sustrato liberando ácido siálico que se podía medir. Se añadió reactivo de arsenita para detener la actividad enzimática. La cantidad de ácido siálico liberado se determinó químicamente con ácido tiobarbitúrico que produce un color rosa que era proporcional a la cantidad de ácido siálico libre. La cantidad de color (cromóforo) se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 549 nm. Utilizando este método, se determinó la actividad neuraminidasa en fracciones de gradiente de sacarosa que contenían VLP de la gripe (Figura 10). Tal y como se esperaba, la actividad se observó en varias fracciones, siendo máxima en dos fracciones. Como control positivo se usó el virus de la gripe de tipo silvestre. El virus de la gripe de tipo silvestre presentaba actividad enzimática neuraminidasa comparable a la de las VLP de la gripe purificadas. Estas observaciones corroboraban los resultados de la HA en cuanto a la conformación de la proteína y sugerían que las VLP purificadas del virus de la gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) eran funcionalmente similares al virus de la gripe de tipo silvestre.

20 **[0052]** Los resultados de los análisis y los ensayos anteriores indicaban que la expresión de las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) era suficiente para el autoensamblaje y transporte de VLP funcionales desde células de insecto infectadas con baculovirus. Dado que estas VLP de la gripe representaban proteínas estructurales del virus de la gripe autoensambladas y mostraban propiedades funcionales y bioquímicas similares a las del virus de la gripe de tipo silvestre, estas VLP de la gripe conservaban conformaciones estructurales importantes, incluidos los epítomos de superficie necesarios para obtener vacunas antigripales eficaces.

25 **EJEMPLO 2: Clonación mediante RT-PCR de genes del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99**

30 **[0053]** Es un objeto de la presente invención proporcionar secuencias sintéticas de ácido nucleico capaces de dirigir la producción de proteínas recombinantes del virus de la gripe. Dichas secuencias sintéticas de ácido nucleico se obtuvieron mediante los métodos de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ARN genómico natural del virus de la gripe aislado del virus. Para los fines de esta solicitud, secuencia de ácido nucleico se refiere a ARN, ADN y ADNc o cualquier variante sintética de los mismos que codifican para la proteína.

35 **[0054]** El virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) fue proporcionado por el Dr. K. Subbarao (Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU.). El ARN genómico viral se aisló mediante el método de extracción ácida fenólica de ARN en unas condiciones de confinamiento de Nivel de Bioseguridad 3 (BSL 3) en el CDC utilizando reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las moléculas de ADNc de los ARN virales se obtuvieron mediante transcripción inversa utilizando transcriptasa inversa MuLV (InVitrogen) y PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos de las proteínas HA, NA y M1 y ADN polimerasa Taq I (InVitrogen) (Tabla 1). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector de subclonación bacteriano, pCR2.1TOPO (InVitrogen), entre los sitios *Eco* RI, dando como resultado tres plásmidos recombinantes que contenían los clones de ADNc de HA, NA y M1.

40 **EJEMPLO 3: Clonación mediante RT-PCR de genes del virus de la gripe humana A/Sydney/5/94 (H3N2)**

45 **[0055]** El virus de la gripe A/Sydney/5/94 (H3N2) se obtuvo del Dr. M. Massare (Novavax, Inc., Rockville, MD). El ARN genómico viral se aisló mediante el método de extracción fenólica de ARN en unas condiciones de confinamiento de BSL2 en Novavax, Inc. utilizando reactivo Trizol LS (Invitrogen). Las moléculas de ADNc de los ARN virales se obtuvieron mediante transcripción inversa y PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos específicos de las proteínas HA, NA, M1, M2 y NP (Tabla 2). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector de subclonación bacteriano, pCR2.1TOPO, entre los sitios *Eco* RI, dando como resultado cinco plásmidos recombinantes que contenían los clones de ADNc de HA, NA, M1, M2 y NP.

50 **EJEMPLO 4: Clonación de los ADNc del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 en vectores de transferencia baculovirus**

55 **[0056]** A partir de los plásmidos basados en pCR2.1TOPO, se subclonaron los genes HA, NA o M1 en el vector de transferencia baculovirus pFastBac1 (InVitrogen) en el locus de la poliedrina y en sitios *att* Tn7 y cadena abajo del promotor de la poliedrina del baculovirus y cadena arriba de la secuencia de la señal de poliadenilación. Los genes virales se ligaron con la ADN ligasa T4. Para el gen HA, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-HA obtenido con *Bam* HI-*Kpn* I en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido como *Bam* HI-*Kpn* I. Para el gen NA, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-NA obtenido con *Eco* RI en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido por *Eco* RI. Para el gen M1, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-M1 obtenido con *Eco* RI en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido con *Eco* RI. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α (InVitrogen) competentes con estas reacciones de ligación de ADN, se obtuvieron colonias transformadas y se aislaron clones bacterianos. Los plásmidos basados en pFastBac1 resultantes, pFastBac1-HA, pFastBac1-NA y pFastBac1-M1 se caracterizaron mediante cartografía con enzimas de restricción en geles de agarosa (Figura 4A). Las secuencias de nucleótidos mostradas en las Figuras 1-3 de los genes clonados se determinaron mediante secuenciación automatizada de ADN. El análisis de la secuencia de ADN mostró que los genes

HA, NA y M1 del virus de la gripe clonados eran idénticos a las secuencias de nucleótidos de estos genes publicadas anteriormente [genes NA, HA y M1 del virus de la gripe A/Hong Kong/ 1073/99 (H9N2) (números de acceso de GenBank AJ404629, AJ404626 y AJ278646, respectivamente)].

5 **EJEMPLO 5: Clonación de ADNc del virus de la gripe humana A/Sydney/5/94 en vectores de transferencia baculovirus**

10 **[0057]** A partir de los plásmidos basados en pCR2.1TOPO, se subclonaron los genes HA, NA, M1, M2 y NP en el vector de transferencia baculovirus pFastBac1 en el locus de la poliedrina y en sitios *att* Tn7 y cadena abajo del promotor de la poliedrina del baculovirus y cadena arriba de la secuencia de la señal de poliadenilación. Los genes virales se ligaron con la ADN ligasa T4. Para el gen HA, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-hHA3 obtenido con *Bam* HI-*Kpn* I en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido como *Bam* HI-*Kpn* I. Para el gen NA, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-hNA obtenido con *Eco* RI en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido por *Eco* RI. Para el gen M1, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-hM1 obtenido con *Eco* RI en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido por *Eco* RI. Para el gen M2, se insertó un fragmento de ADN de pCR2.1TOPO-hM2 obtenido con *Eco* RI en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido con *Eco* RI. Para el gen NP, se insertó un fragmento de pCR2.1TOPO-hNP obtenido con *Eco* RI en el ADN del plásmido pFastBac1 digerido por *Eco* RI. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes con estas reacciones de ligación de ADN, se obtuvieron colonias transformadas y se aislaron clones bacterianos. Los plásmidos basados en pFastBac1 resultantes, pFastBac1-hHA3, pFastBac1-hNA pFastBac1-hM1, pFASTBAC1-hM2 y pFASTBAC1-hNP se caracterizaron mediante cartografía con enzimas de restricción en geles de agarosa. Las secuencias de nucleótidos de los genes clonados se determinaron mediante secuenciación automatizada de ADN. El análisis de la secuencia de ADN mostró que los genes HA, NA, M1, M2 y NP del virus de la gripe clonados eran idénticos a las secuencias nucleotídicas de estos genes publicadas anteriormente.

25 **EJEMPLO 6: Construcción de vectores de transferencia baculovirus multigénicos que codifican para múltiples genes del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99**

30 **[0058]** Con el fin de construir vectores de transferencia bacmid basados en pFastBac1 que expresen múltiples genes del virus de la gripe A/Hong Kong/ 1073/99 (H9N2), se clonó inicialmente un fragmento de ADN, obtenido con *Sna* BI-*Hpa* I, del plásmido pFastBac1-M1 que contenía el gen M1 en el sitio *Hpa* I de pFastBac1-HA. Esto dio como resultado un plásmido pFastBac1-HAM que codificaba para los genes HA y M1 en casetes de expresión independientes y que se expresaba bajo el control de distintos promotores de la poliedrina.

35 **[0059]** Por último, se transfirió un segmento de ADN, obtenido con *Sna* BI-*Avr* II, del pFastBac1-HAM que contenía los casetes de expresión de HA y M1 en ADN del plásmido pFastBac1-NA digerido con *Hpa* I-*Avr* II. Esto dio lugar al plásmido pFastBac1-NAHAM que codificaba para tres casetes de expresión independientes para expresión de los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe y que se expresaba bajo el control de distintos promotores de la poliedrina (Figura 4B).

40 **[0060]** En otro ejemplo, el gen H3 de pFASTBAC1-hHA3 (véase el Ejemplo 5) se clonó en pFASTBAC1-NAHAM como un cuarto gen del virus de la gripe para la expresión y producción de VLP heterotípicas de la gripe.

EJEMPLO 7: Generación de baculovirus recombinantes multigénicos que codifican para los genes NA, HA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 en células de insecto

45 **[0061]** Se usó el vector de transferencia bacmid multigénico resultante pFastBac1-NAHAM para generar un baculovirus recombinante multigénico que codifica para los genes HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) para su expresión en células de insecto. Los ADN bacmid recombinantes se produjeron mediante recombinación específica del sitio en las secuencias de ADN de la poliedrina y *att* Tn7 entre el ADN pFastBac1-NAHAM y el genoma del baculovirus AcMNPc albergado en células de *E. coli* DH10BAC competentes (InVitrogen) (Figura 4B). El ADN bacmid recombinante se aisló mediante el método de extracción de ADN plasmídico miniprep y se transfirió en células Sf-9s utilizando el lípido catiónico CELLFECTIN (InVitrogen). Tras la transfección, se aislaron baculovirus recombinantes, se purificó la placa y se amplificó en células de insecto Sf-9S. Las reservas de virus se prepararon en células de insecto Sf-9S y se caracterizaron para la expresión de los productos génicos HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar. El baculovirus recombinante resultante se designó bNAHAM-H9N2.

55 **EJEMPLO 8: Expresión de las proteínas del virus de la gripe aviar Thong Kong/1073/99 recombinantes en células de insecto**

60 **[0062]** Las células de insecto Sf-9S mantenidas como cultivos en suspensión en matraces agitadores a 28°C en medio sin suero (HyQ SFM, HyClone, Ogden, UT) se infectaron a razón de una densidad celular de 2×10^6 células/ml con el baculovirus recombinante, bNAHAM-H9N2 y a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 ufc/célula. Se procedió a un período de infección vírica de 72 horas para permitir la expresión de las proteínas del virus de la gripe. La expresión de las proteínas HA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) en células de insecto infectadas se confirmó mediante análisis SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western. El análisis SDS-PAGE se llevó a cabo en geles NuPAGE de gradiente lineal 4-12% (Invitrogen) en condiciones reductoras y desnaturizantes. Los anticuerpos primarios del análisis de inmunotransferencia de Western eran un antisuero policlonal de conejo producido

frente al virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) obtenido del CDC y antisuero monoclonal murino frente a la proteína M1 de la gripe (Serotec, RU). Los anticuerpos secundarios para el análisis de inmunotransferencia de Western fueron antisuero IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina producido contra IgG de conejo o ratón (H+L) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EE.UU.). Los resultados de estos análisis (Figura 5) indicaban que las proteínas HA y M1 se expresaban en las células de insecto infectadas con baculovirus.

EJEMPLO 9: Purificación de partículas similares al virus de la gripe aviar H9N2 recombinantes y complejos de proteínas macromoleculares

[0063] Se cosecharon mediante centrifugación a baja velocidad los sobrenadantes del cultivo (200 ml) de células de insecto Sf-9S infectadas con el baculovirus recombinante bNAHAM-H9N2 que expresaba los productos génicos HA, NA y M1 del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Los sobrenadantes del cultivo se clarificaron por centrifugación en una centrífuga de alta velocidad Sorval RC-5B durante 1 h a 10.000 x g y 4°C utilizando un rotor GS-3. Se aislaron virus y VLP de los sobrenadantes del cultivo clarificados mediante centrifugación en una ultracentrífuga Sorval OTD-65 durante 3 h a 27.000 rpm y 4° utilizando un rotor con cubeta oscilante Sorval TH-641. El sedimento viral se volvió a suspender en 1 ml de PBS (pH 7,2), se cargó en un gradiente discontinuo de sacarosa 20-60% (p/v) y se resolvió mediante centrifugación en una centrífuga de alta velocidad Sorval OTD-65 durante 16 h a 27.000 rpm y 4°C usando un rotor Sorval TH-641. Se recogieron fracciones (0,5 ml) de la parte superior del gradiente de sacarosa.

[0064] Las proteínas de la gripe de las fracciones del gradiente de sacarosa se analizaron mediante análisis SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western como se ha descrito en el Ejemplo 6. Las proteínas HA y M1 se detectaron en las mismas fracciones del gradiente de sacarosa (Figura 6) que las mostradas mediante análisis de transferencia de Western y sugerían que las proteínas HA y M1 estaban asociadas como complejos proteicos macromoleculares. También se detectaron proteínas HA y M1 en fracciones por todo el gradiente de sacarosa, lo que sugiere que estas proteínas virales recombinantes estaban asociadas a complejos proteicos macromoleculares de diferentes densidades y composiciones.

EJEMPLO 10: Análisis de VLP y proteínas del virus de la gripe aviar H9N2 recombinantes mediante cromatografía de filtración en gel

[0065] Las macromoléculas proteicas, tales como las VLP y las proteínas monoméricas migran de forma diferente en columnas cromatográficas de filtración en gel o de exclusión molecular en función de su masa y forma. Para determinar si las proteínas de la gripe recombinantes de las fracciones del gradiente de sacarosa eran proteínas monoméricas o complejos proteicos macromoleculares, tales como VLP, se preparó una columna de cromatografía (7 mm x 140 mm) con un volumen de lecho de resina de 14 ml de Sepharose CL-4B (Amersham). La columna de exclusión molecular se equilibró con PBS y se calibró con Azul Dextrano 2000, Amarillo Dextrano y Vitamina B12 (Amersham Pharmacia) con pesos moleculares aparentes de 2.000.000; 20.000 y 1.357, respectivamente, para determinar el volumen hueco de la columna. El Azul Dextrano 2000 eluyó de la columna en el volumen hueco (fracción de 6 ml). Tal y como se esperaba, los complejos de proteína del virus de la gripe recombinante también eluían de la columna en el volumen hueco (fracción de 6 ml). Este resultado era característico de un complejo proteico de alto peso molecular, tal como VLP. Las proteínas virales de las fracciones de la columna se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia de Western como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6. Las proteínas M1 se detectaron en las fracciones del volumen muerto (Figura 7). Tal y como se esperaba, las proteínas del baculovirus también se detectaban en el volumen hueco.

EJEMPLO 11: Microscopía electrónica de las VLP de la gripe recombinantes

[0066] Para determinar si los complejos proteicos macromoleculares aislados en gradientes de sacarosa y que contienen proteínas del virus de la gripe recombinantes tenían morfologías similares a los viriones de la gripe, se realizó un examen de microscopía electrónica de muestras teñidas negativamente. Los complejos proteicos recombinantes del virus de la gripe aviar A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) se concentraron y se purificaron de los sobrenadantes de los cultivos mediante ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa como se ha descrito en el Ejemplo 7. Se trataron alícuotas de las fracciones del gradiente de sacarosa con glutaraldehído 2% en PBS, pH 7,2, se absorbieron en rejillas recubiertas con plástico/carbono recién preparadas y se lavaron con agua destilada. Las muestras se tiñeron con fosfotungstato sódico al 2%, pH 6,5 y se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Philips). Las fotografías de microscopía electrónica de las muestras teñidas negativamente de los complejos proteicos del virus de la gripe aviar H9N2 recombinantes de dos fracciones de gradiente de sacarosa mostraron partículas esféricas y en forma de bastoncillo (Figura 8). Las partículas tenían diferentes tamaños (60 y 80 nm) y morfologías. También se detectaron complejos más grandes de ambos tipos de partículas, así como partículas con forma de bastoncillo (Figura 8). Todas las estructuras del complejo proteico observadas mostraban proyecciones superficiales a modo de espículas parecidas a los peplómeros HA y NA del virus de la gripe. Dado que el tamaño y aspecto de las partículas de 80 nm era similar al de las partículas del virus de la gripe de tipo silvestre, estas estructuras probablemente representaban VLP de virus de la gripe envuelto. Las partículas más pequeñas de aproximadamente 60 nm probablemente representaban partículas subvirales que se diferenciaban de las VLP anteriores tanto morfológicamente como estructuralmente.

EJEMPLO 12: Análisis de las características funcionales de las proteínas de la gripe mediante ensayo de hemaglutinación

[0067] Para determinar si las VLP y las proteínas de la gripe purificadas poseían actividades funcionales, tales como actividad de hemaglutinación y neuraminidasa, que son características del virus de la gripe, las VLP y las proteínas de la gripe purificadas se analizaron en ensayos de hemaglutinación y neuraminidasa.

5 **[0068]** Para el ensayo de hemaglutinación, se preparó una serie de diluciones 1/2 de las fracciones del gradiente de sacarosa que contenían las VLP de la gripe o control positivo del virus de tipo silvestre de la gripe de tipo A. A continuación se mezclaron con eritrocitos de cobaya 0,6% en PBS (pH 7,2) y se incubaron a 4°C durante 1 a 16 h. Como control negativo se usó PBS. El grado de hemaglutinación se determinó visualmente y se determinó la dilución más alta de fracción capaz de aglutinar los eritrocitos de cobaya (Figura 9). El título de hemaglutinación más alto observado para las VLP y proteínas de la gripe purificadas fue 1:4000, título que era más alto que el observado con el control de la gripe de tipo silvestre que era 1:2000.

EJEMPLO 13: Análisis de las características funcionales de las proteínas de la gripe mediante el ensayo de neuraminidasa

15 **[0069]** La cantidad de actividad neuraminidasa en las fracciones de gradiente de sacarosa que contenían VLP de la gripe se determinó mediante el ensayo de la neuraminidasa. En este ensayo, la NA (una enzima) actuaba sobre el sustrato (fetuina) y liberaba ácido siálico. Se añadió reactivo arsenita para detener la actividad enzimática. La cantidad de ácido siálico liberado se determinó químicamente con el ácido tiobarbitúrico que producía un color rosa en proporción al ácido siálico libre. La cantidad de color (cromóforo) se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 594 nm. Los datos, como se muestran en la Figura 8, mostraban que las fracciones de gradientes de sacarosa que contenían VLP producían una cantidad significativa de ácido siálico y que estas fracciones correspondían a las fracciones que presentaban actividad de hemaglutinación.

25 **EJEMPLO 13: Inmunización de ratones BALB/c con VLP de la gripe H9N2 recombinantes homotípicas**

[0070] La inmunogenicidad de las VLP de la gripe recombinantes se determinó mediante inmunización de los ratones seguido de análisis de transferencia de Western de los sueros inmunes. Las VLP recombinantes (1 µg/inyección) que contenían proteínas HA, NA y M1 virales del virus de la gripe aviar de tipo A/Hong Kong/1073/99 y purificadas en gradientes de sacarosa se inocularon por vía subcutánea en la región deltoide de diez (10) ratones BALB/c hembra el día 0 y el día 28 (Figura 11). Se administró de forma similar PBS (pH 7,2) como control negativo a cinco (5) ratones. Se extrajo sangre de la cavidad supraorbital el día-1 (antes de la extracción), día 27 (extracción primaria) y el día 54 (extracción secundaria). Se recogieron sueros de las muestras de sangre tras coagulación y centrifugación durante la noche.

35 **[0071]** Para el análisis de transferencia de Western, se desnaturalizaron (95°C, 5 minutos) 200 ng de virus de la gripe aviar de tipo A H9N2 inactivado o de virus de la gripe aviar de tipo A H9N2 adaptados al frío, así como patrones de proteína teñidos previamente con See Blue Plus 2 (InVitrogen) y se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras (β-mercaptoetanol 10 mM) en geles NuPAGE de gradiente de poliacrilamida 4-12% (InVitrogen) en tampón MES a 172 voltios hasta que desaparecía el colorante marcador azul de bromofenol. Para los geles de proteínas, las proteínas sometidas a electroforesis se visualizaron mediante tinción con reactivo Azul de Coomassie Coloidal (InVitrogen). Las proteínas se transfirieron del gel a las membranas de nitrocelulosa en metanol mediante el procedimiento de transferencia de Western convencional. Los sueros de ratones inmunizados con VLP y de conejos inmunizados con el virus de la gripe aviar H9N2 inactivado (sueros control positivo) se diluyeron 1:25 y 1:200, respectivamente, en solución PBS (pH 7,2) y se usaron como anticuerpo primario. Las membranas unidas a las proteínas, que se bloquearon con caseína 5%, se hicieron reaccionar con antisueros primarios durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Tras el lavado de las membranas con los anticuerpos primarios con solución salina de tampón fosfato que contiene Tween 20, los antisueros secundarios [conjugado IgG de cabra anti-murino – fosfatasa alcalina (1:10.000) o conjugado de IgG de cabra anti-conejo – fosfatasa alcalina (1:10.000)] se hicieron reaccionar durante 60 minutos con la membrana. Tras el lavado de las membranas con los anticuerpos secundarios con solución salina con tampón fosfato que contenía Tween 20, las proteínas de unión a anticuerpos de las membranas se visualizaron mediante el desarrollo con sustrato cromogénico, tal como NBT/BCIP (InVitrogen).

50 **[0072]** Los resultados del análisis de transferencia de Western (Figura 12) fueron que las proteínas con pesos moleculares similares a los de las proteínas HA y M1 virales (75 y 30 kd, respectivamente) se unieron a los sueros control positivos (Figura 12B) y los sueros de ratones inmunizados con las VLP de la gripe H9N2 recombinantes (Figura 12A). Estos resultados indicaban que las VLP de la gripe H9N2 recombinantes eran inmunogénicas en ratones mediante esta vía de administración.

60 **[0073]** Referencias hechas:

Berglund, P., Fleeton, M. N., Smerdou, C., y Liljestrom, P. (1999). Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497-507.

Cox, J. C., y Coulter, A. R. (1997). Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248-256.

- 5 Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., y Perdue, M.L. (1999). Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17, 2265-2274.
- 10 Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 17, 943-50.
- 15 Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., y Portela, A. (1999). Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1635-1645.
- 20 Johansson, B. E. (1999). Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in re-combinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine* 17, 2073-2080.
- 25 Lakey, D.L., Treanor, J.J., Betts, B.F., Smith, G.E., Thompson, J., Sannella, E., Reed, G., Wilkinson, B.E., y Wright, P.E. (1996) Recombinant baculovirus influenza A hemagglutinin vaccines are well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 174, 838-841.
- 30 Latham, T., y Galarza, J. M. (2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* 75, 6154-6165.
- 35 Mena, I., Vivo, A., Perez, E., y Portela, A (1996). Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.* 70, 5016-5024.
- 40 Murphy, B. R., y Webster, R. G. (1996). Orthomyxoviruses. In "Virology" (D. M. K. B. N. Fields, P. M. Howley, Eds.) Vol. 1, pp. 1397-1445. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- 45 Neumann, G., Watanabe, T., y Kawaoka, Y. (2000). Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J. Virol.* 74, 547-551.
- 50 Olsen, C. W., McGregor, M. W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B. R., Nelson, K. M., Lunn, D. P., Macklin, M. D., y Swain, W. F. (1997). Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 15, 1149-1156.
- 55 Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., y Shortridge, K. F. (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southwestern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75, 9679-9686.
- 60 Pumpens, P., y Grens, E. (2003). Artificial genes for chimeric virus-like particles. In: "Artificial DNA" (Khudyakov, Y. E., y Fields, H. A., Eds.) pp. 249-327. CRC Press, Nueva York.
- 65 Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R.E., y Smith, J.F. (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239, 389-401.
- 70 Slepishkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A., y Cox, N. J. (1995). Protection of mice against influenza A virus challenged by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* 13, 1399-1402.
- 75 Treanor, J. J., Betts, R. F., Smith, G. E., Anderson, E. L., Hackett, C. S., Wilkinson, B. E., Belshe, R. B., y Powers, D. C. (1996). Evaluation of a recombinant hemagglutinin expressed in insect cells as an influenza vaccine in young and elderly adults. *J. Infect. Dis.* 173, 1467-1470.
- 80 Tsuji, M., *et al.* (1998). Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.* 72, 6907-6910.
- 85 Ulmer, J. B., *et al.* (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.
- 90 Ulmer, J. B., *et al.* (1998). Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.* 72, 5648-5653.
- 95 Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., y Kawaoka, Y. (2002) Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* 76, 767-773.
- 100 Zhou, X., *et al.* (1995). Generation of cytotoxic and humoral immune responses by non-replicative recombinant

Semliki Forest virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3009-3013.

Otras realizaciones

- 5 **[0074]** Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar no utilizando nada más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes estén abarcados en la medida que se incluyan en las siguientes reivindicaciones:

TABLA 1

Fracción N ^o *	Título
1	< 1:500
3	< 1:500
5	1:500
7	1:1000
9	1:2000
11	1:2000
12	1:4000
14	1:500
16	< 1:500
PBS**	< 1:500
A/Shangdong/9/93***	1:1000

* Fracciones del gradiente de sacarosa 20-60%

** Control negativo

*** Control positivo

TABLA 2

Virus	Cepa	Gen	RT-PCR	Cebador
Tipo A (H3N2)	Sydney/5/97	Hemaglutinina (HA)	Directa	5'-A <u>GGATCC</u> ATG AAGACTATCATTTGCTTTGAG-3'
			Inversa	5'-A <u>GGTACC</u> TCAAATGCAAAATGTTGCACCTAATG-3'
		Neuraminidasa (NA)	Directa	5'-GGGACAGTTTGTACA AAAAA AGCAGGCTTAGAAG GAGATAGAACC ATG AATCCAAATCAAAGATAATAAC3'
			Inversa	3'-GGGACCCTTTGTACA AAAAA AGCTGGGTCTATAT AGGCATGAGATTGATGTCCG3'
		Matriz (M1)	Directa	5'-AAA GAATTC ATG AGTCTTCTAACCCGAGGTCGAAAACGTA-3'
			Inversa	5'-AAA TTCGAA TTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC-3'
		M2	Directa	5'-A <u>GAATTC</u> ATG AGTCTTCTAACCCGAGGTCGAAAACGCT ATCGAAACCAATGGGGTCC3'
				5'-AAA TTCGAA TTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC-3'
		Nucleoproteína (NP)	Directa	5'-A <u>GAATTC</u> ATG GCGTCCCAAGGCCACCAACCG3'
				5'-A <u>GCGCCGGCTTA</u> TTGTGTACTCTCTCTGCAATTGTCTCGAA GAAATAAG-3'
Inversa				
Tipo B	Harbin	Hemaglutinina (HA)	Directa	5'-A <u>GAATTC</u> ATG AAGGCAATAATTGTACTACTCATGG-3'
			Inversa	5'-A <u>GCGCCGGCTTA</u> TAGACAGATGGAGCAAGAAACATTGTC TCTGGAG-3'
		Neuraminidasa (NA)	Directa	5'-A GAATT CATG CTACCTTCAACTATACAAAACG-3'
			Inversa	5'-A <u>GCGCCGGCTTA</u> CAGAGCCATATCAACACCTGTGACAGTG-3'

LISTADO DE SECUENCIAS

[0075]

5 <110> Novavax, Inc.

<120> PARTÍCULAS SIMILARES AL VIRUS (VLP) DE LA GRIPE FUNCIONALES

<130> 19065/2028

10

<150> US 10/617.569

<151> 17-11-2003

<160> 3

15

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1404

20

<212> ADN

<213> Aviar

<400> 1

```

atgaatccaa atcaaaagat aatagcactt ggctctgttt ctataactat tgcgacaata 60
tgtttactca tgcagattgc catcttagca acgactatga cactacattt caatgaatgt 120
accaacccat cgaacaatca agcagtgcca tgtgaaccaa tcataataga aaggaacata 180
acagagatag tgcatttgaa taatactacc atagagaagg aaagttgtcc taaagtagca 240
gaatacaaga attgggtcaaa accgcaatgt caaattacag ggttcgcccc tttctccaag 300
gacaactcaa ttaggctttc tgcaggcggg gatatttggg tgacaagaga accttatgta 360
tcgtgcgggc ttggtaaagt ttaccaattt gcacttgggc agggaaccac tttgaacaac 420
aaacactcaa atggcacaat acatgatagg agtccccata gaaccctttt aatgaacgag 480
ttgggtgttc catttcattt gggaaaccaa caagtgtgca tagcatggtc cagctcaagc 540
tgccatgatg ggaaggcatg gttacatggt tgtgtcactg gggatgatag aaatgcgact 600
gctagcatca tttatgatgg gatgcttacc gacagttattg gttcatggtc taagaacatc 660
ctcagaactc aggagtcaga atgcgtttgc atcaatggaa cttgtacagt agtaatgact 720
gatggaagtg catcaggaag ggctgatact aaaatactat tcattagaga agggaaaatt 780
gtccacattg gtccactgtc aggaagtgtc cagcatgtgg aggaatgctc ctgttaccac 840
cggtatccag aagttagatg tgtttgcaga gacaattgga agggctccaa tagaccctgt 900
ctatatataa atgtggcaga ttatagtgtt gattctagtt atgtgtgctc aggacttggt 960
ggcgacacac caagaaatga cgatagctcc agcagcagta actgcagggg tcctaataac 1020
gagagagggg gcccaggagt gaaaggggtg gcctttgaca atggaaatga tgtttggatg 1080
ggacgaacaa tcaagaaaga ttcgcgtctt ggttatgaga ctttcagggt cgttggtggt 1140
tggactacgg ctaattccaa gtcacaata aataggcaag tcatagttga cagtgataac 1200
tggctctgggt attctggtat attctctggt gaaggaaaaa cctgcatcaa caggtgtttt 1260
tatgtggagt tgataagagg gagaccacag gagaccagag tatgggtggac ttcaaatagc 1320
atcattgtat tttgtggaac ttcaggtacc tatggaacag gctcatggcc cgatggagcg 1380
aatatcaatt tcatgtctat ataa 1404

```

25

<210> 2

<211> 1683

<212> ADN

30

<213> Aviar

<400> 2

atggaacaa	tatcactaat	aactatacta	ctagtagtaa	cagcaagcaa	tgagataaa	60
atctgcatcg	gccaccagtc	aacaaactcc	acagaaactg	tggacacgct	aacagaaacc	120
aatgttctcg	tgacacatgc	caaagaattg	ctccacacag	agcataatgg	aatgctgtgt	180
gcaacaagcc	tgggacatcc	cctcattcta	gacacatgca	ctattgaagg	actagtctat	240
ggcaaccctt	cttgtgacct	gctgttggga	ggaagagaat	ggtcctacat	cgtcgaaaga	300
tcacagctg	taaatggaac	gtgttaccct	gggaatgtag	aaaacctaga	ggaactcagg	360
acacttttta	gttccgctag	ttcctaccaa	agaatccaaa	tcttcccaga	cacaacctgg	420
aatgtgactt	acactggaac	aagcagagca	tgttcagggt	cattctacag	gagtatgaga	480
tggctgactc	aaaagagcgg	ttttaccct	gttcaagacg	cccaatacac	aaataacagg	540
ggaaagagca	ttcttttctg	gtggggcata	catcaccac	ccacctatac	cgagcaaaca	600
aatttgata	taagaaacga	cacaacaaca	agcgtgacaa	cagaagattt	gaataggacc	660
ttcaaacag	tgatagggcc	aaggcccctt	gtcaatggtc	tgaggggaag	aattgattat	720
tattggtcgg	tactaaaacc	aggccaaaca	ttgcgagtac	gatccaatgg	gaatctaatt	780
gctccatggt	atggacacgt	tctttcagga	gggagccatg	gaagaatcct	gaagactgat	840
ttaaaagggtg	gtaattgtgt	agtgcattgt	cagactgaaa	aagggtggctt	aaacagtaca	900
ttgccattcc	acaatatcag	taaatatgca	tttggaaact	gccccaaata	tgraagagtt	960
aatagtctca	aactggcagt	cggtctgagg	aacgtgcctg	ctagatcaag	tagaggacta	1020
tttgagacca	tagctggatt	catagaagga	ggttggccag	gactagtcgc	tggtgtgtat	1080

ggtttccagc	attcaaatga	tcaagggggt	ggtatggctg	cagatagggg	ttcaactcaa	1140
aaggcaattg	ataaaataac	atccaagggtg	aataatatag	tcgacaagat	gaacaagcaa	1200
tatgaaataa	ttgatcatga	attcagtgag	gttgaaacta	gactcaatat	gatcaataat	1260
aagattgatg	accaaataca	agacgtatgg	gcatataatg	cagaattgct	agtactactt	1320
gaaaatcaaa	aaacactcga	tgagcatgat	gcaaacgtga	acaatctata	taacaagggtg	1380
aagagggcac	tgggctccaa	tgctatggaa	gatgggaaag	gctgtttcga	gctataccat	1440
aaatgtgatg	atcagtgcat	ggaacaatt	cggaacggga	cctataatag	gagaaagtat	1500
agagaggaat	caagctaga	aaggcagaaa	atagaggggg	ttaagctgga	atctgagggg	1560
acttacaaaa	tcctcaccat	ttatctgact	gtcgcctcat	ctcttgctg	tgcaatgggg	1620
tttctgctc	tcctgttctg	ggccatgtcc	aatggatcct	gcagatgcaa	catttgata	1680
taa						1683

- 5 <210> 3
- <211> 759
- <212> ADN
- <213> Aviar

10 <400> 3

atgagtcttc	taaccgaggt	cgaaacgtac	gttctctcta	tcatcccac	aggccccctc	60
aaagccgaga	tcgctgagag	acttgaggat	gtttttgcat	ggaagaacac	agatcttgag	120
gctctcatgg	aatggctaaa	gacaagacca	atcctgtcac	ctctgactaa	ggggatttta	180
gggtttgtgt	tcacgctcac	cggtgccagt	gagcgaggac	tgacgctgag	acgatttgtc	240
caaaatgccc	taaatgggaa	tggagaccca	aacaacatgg	acagggcagt	taaactatac	300
aagaagctga	agagggaaat	gacattccat	ggagcaaagg	aagttgact	cagtactca	360
actggtgctc	ttgccagttg	catgggtctc	atatacaacc	ggatgggaac	agtgaccaca	420
gaagtggctc	ttggcctagt	atgtgccact	tgtgaacaga	ttgctgatgc	ccaacatcgg	480
tcccacaggg	agatggcgac	taccaccaac	ccactaatca	ggcatgagaa	cagaatggta	540
ctagccagca	ctacggctaa	ggccatggag	cagatggctg	gatcaagtga	gcagggcagca	600
gaagccatgg	aagtcgcaag	tcaggctagg	caaatggtgc	aggctatgag	gacaattggg	660
actcaccta	gttccagtg	aggtctaaaa	gatgatctta	ttgaaaattt	gcaggcttac	720
cagaaacgga	tgggagtgca	aatgcagaga	ttcaagtga			759

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una VLP derivada de la gripe, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 a) construir una construcción de baculovirus recombinante que codifica un grupo de proteínas estructurales de la gripe, consistiendo dicho grupo en M1, HA y NA;
 - b) transfectar, infectar o transformar una célula hospedadora adecuada con dicho baculovirus recombinante y cultivar la célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de M1, HA y NA;
 - 10 c) permitir la formación de una VLP en dicha célula hospedadora, en la que las proteínas estructurales del virus de la gripe de dicha VLP consisten en M1, HA y NA;
 - d) recoger los medios celulares infectados que contienen una VLP de la gripe funcional y
 - e) purificar la VLP.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de M1, HA and NA es de origen aviar o mamífero.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha M1 es de origen aviar.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de dichas M1, H1 y NA deriva del grupo que consiste en los virus de la gripe de subtipo A y B.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la célula hospedadora es una célula eucariota.
- 25 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la VLP comprende una VLP quimérica.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la formulación de un principio activo que comprende la VLP de la gripe.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el principio activo comprende además un adyuvante.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el principio activo es una vacuna.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además la mezcla del principio activo que contiene una VLP de la gripe con una vesícula lipídica.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la vesícula lipídica es una vesícula lipídica no iónica.
- 40 12. Una VLP o composición que comprende una VLP obtenible mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. La VLP o composición de la reivindicación 12 para su uso en un método de tratamiento o prevención de la gripe en un vertebrado o para proporcionar una respuesta inmunitaria protectora frente a la gripe en un vertebrado.
- 45

**ATGAATCCAAATCAAAGATAATAGCACTTGGCTCTGTTTCTATAACTATTGCGACAATATG
TTTACTCATGCAGATTGCCATCTTAGCAACGACTATGACACTACATTTCAATGAATGTACCA
ACCCATCGAACCAATCAAGCAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAGGAACATAACAGAG
ATAGTGCATTTGAATAATACTACCATAGAGAAGGAAAGTTGTCCTAAAGTAGCAGAATACAA
GAATTGGTCAAACCGCAATGTCAAATTACAGGGTTCGCCCTTTCTCCAAGGACAACCTCAA
TTAGGCTTTCTGCAGGCGGGGATATTTGGGTGACAAGAGAACCCTTATGTATCGTGCGGTCTT
GGTAAATGTTACCAATTTGCACTTGGGCAGGGAACCACTTTGAACAACAAACACTCAAATGG
CACAATACATGATAGGAGTCCCATAGAACCTTTTAATGAACGAGTTGGGTGTTCCATTTTC
ATTTGGGAACCAAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAAGCTGCCATGATGGGAAGGCA
TGGTTACATGTTTGTGTCACTGGGGATGATAGAAATGCGACTGCTAGCATCATTATGATGG
GATGCTTACCGACAGTATTGGTTCATGGTCTAAGAACATCCTCAGAACTCAGGAGTCAGAAT
GCGTTTGCATCAATGGAACCTGTACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAAGGGCT
GATACTAAAATACTATTCATTAGAGAAGGGAAAATTGTCCACATTGGTCCACTGTCAGGAAG
TGCTCAGCATGTGGAGGAATGCTCCTGTTACCCCGGTATCCAGAAGTTAGATGTGTTTGCA
GAGACAATTGGAAGGGCTCCAATAGACCCGTGCTATATATAAATGTGGCAGATTATAGTGTT
GATTCTAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTGGCGACACACCAAGAAATGACGATAGCTCCAG
CAGCAGTAACTGCAGGGATCCTAATAACGAGAGAGGGGGCCAGGAGTGAAAGGGTGGGCCT
TTGACAATGGAATGATGTTTGGATGGGACGAACAATCAAGAAAGATTGCGGCTCTGGTTAT
GAGACTTTCAGGGTCGTTGGTGGTTGGACTACGGCTAATCCAAGTCACAAATAAATAGGCA
AGTCATAGTTGACAGTGATAACTGGTCTGGGTATTCTGGTATATTCTCTGTTGAAGGAAAA
CCTGCATCAACAGGTGTTTTTATGTGGAGTTGATAAGAGGGAGACCACAGGAGACCAGAGTA
TGGTGGACTTCAAATAGCATCATTGTATTTTGTGGAACCTCAGGTACCTATGGAACAGGCTC
ATGGCCCGATGGAGCGAATATCAATTCATGTCTATATA**TAA****

Figura 1

ATGGAAACAATATCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAAT
CTGCATCGGCCACCAAGTCAACAAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATG
TTCCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACA
AGCCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCC
TTCTTGTGACCTGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTG
TAAATGGAACGTGTTACCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGT
TCCGCTAGTTCCTACCAAAGAATCCAAATCTTCCCAGACACAACCTGGAATGTGACTTACAC
TGGAACAAGCAGAGCATGTTCAAGGTTTATTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAGA
GCGGTTTTTACCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTTC
GTGTGGGGCATAATCACCCACCCACCTATACCGAGCAAACAAATTTGTACATAAGAAACGA
CACAACAACAAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAGTGATAGGGCCAA
GGCCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCGGTACTAAAACCAGGC
CAAACATTGCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTC
AGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAAT
GTCAGACTGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCA
TTTGGAACCTGCCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCAGTCGGTCTGAGGAA
CGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTCATAGAAGGAGGTT
GGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATG
GCTGCAGATAGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAAATAACATCCAAGGTGAATAATAT
AGTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTCAGTGAGGTTGAAACTA
GACTCAATATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACAAGACGTATGGGCATATAATGCA
GAATTGCTAGTACTACTTGAAAATCAAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAACGTGAACAA
TCTATATAACAAGGTGAAGAGGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTT
TCGAGCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGCATGGAAACAATTCGGAACGGGACCTATAAT
AGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGA
ATCTGAGGGAACCTACAAAATCCTCACCATTTATTCGACTGTCGCCTCATCTTGTGCTTG
CAATGGGGTTTGTGCTCCTTCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATGCAACATT
TGTATATAA

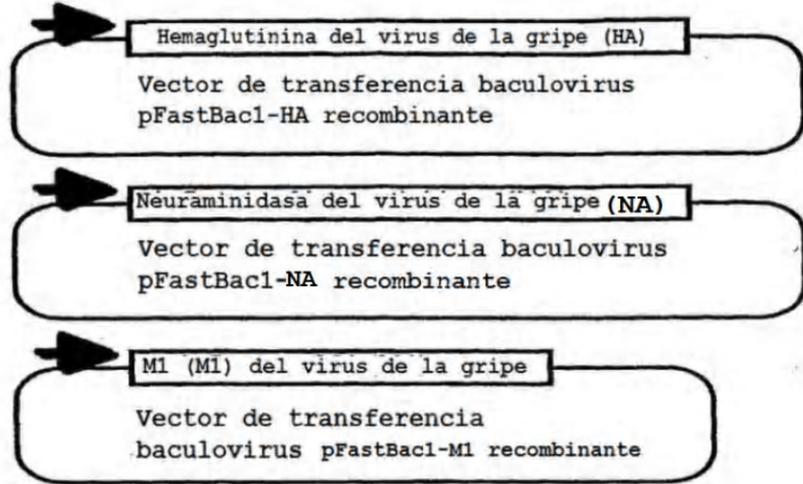
Figura 2

**ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAA
AGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAGGATGTTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTC
TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTT
GTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGATTTGTCCAAAATGC
CCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAAACTATAACAAGAAGCTGA
AGAGGGAAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACTGGTGCGCTT
GCCAGTTGCATGGGTCTCATATAACAACGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTCTTGG
CCTAGTATGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATGCCCAACATCGGTCCCACAGGCAGATGG
CGACTACCACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCT
AAGGCCATGGAGCAGATGGCTGGATCAAGTGAGCAGGCAGCAGAAGCCATGGAAGTCGCAAG
TCAGGCTAGGCAAATGGTGCAGGCTATGAGGACAATTGGGACTCACCTAGTTCCAGTGCAG
GTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTTGCAGGCTTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATG
CAGAGATTCAAGTGA**

Figura 3

(A)

Promotor de la poliedrina



(B)

Promotor de la poliedrina

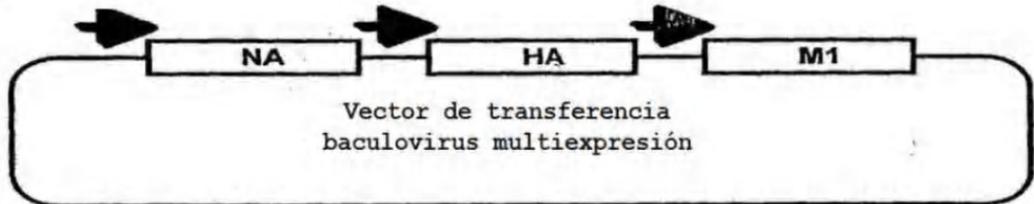


Figura 4

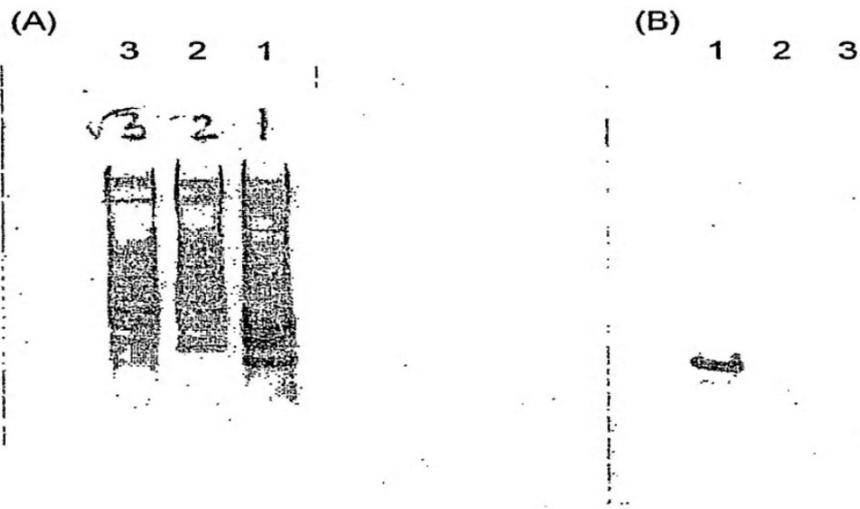


Figura 5

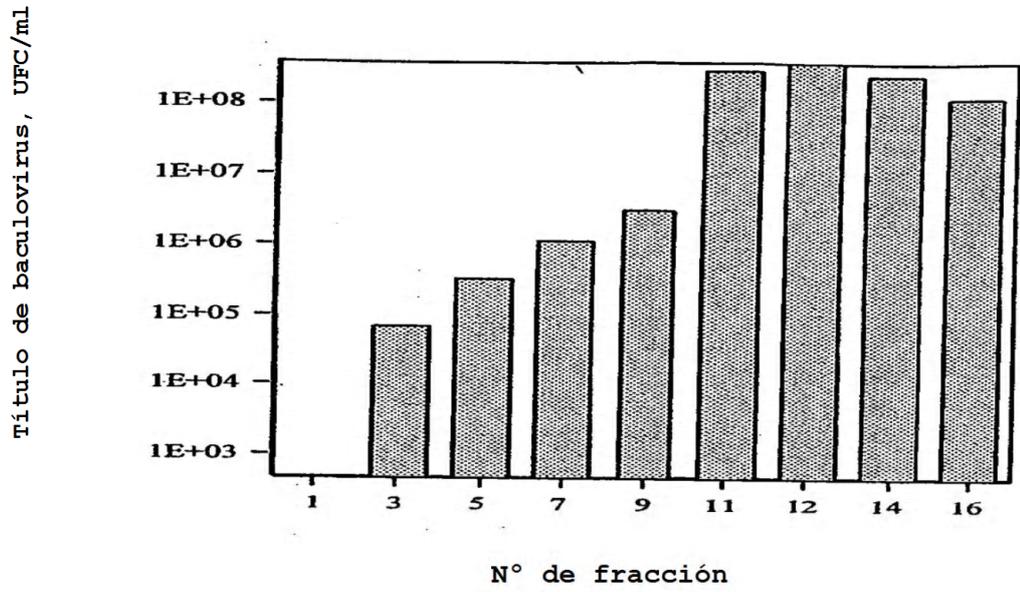


Figura 6

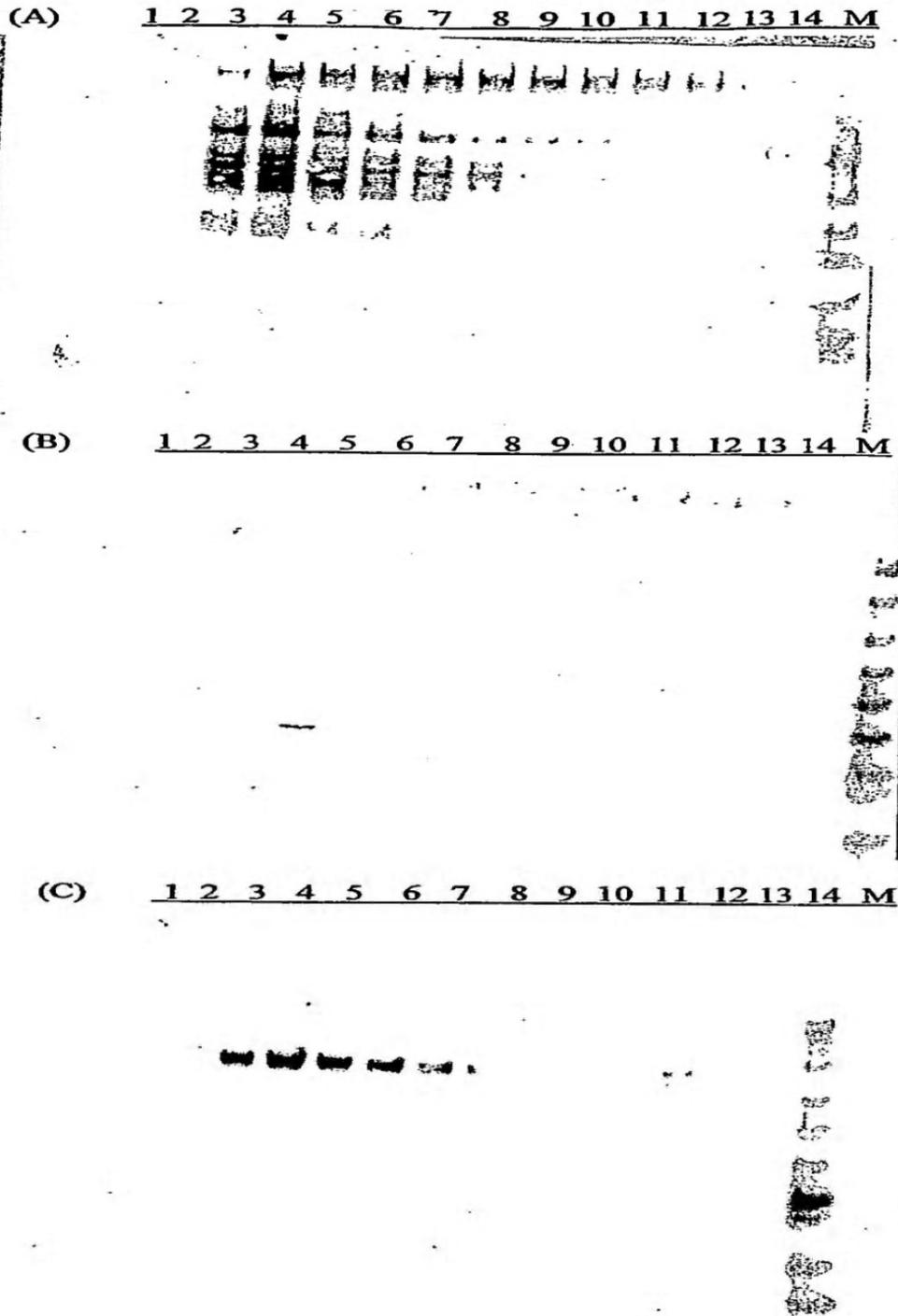


Figura 7



Figura 8

Título de hemaglutinación, $10^{\text{exp}-1}$

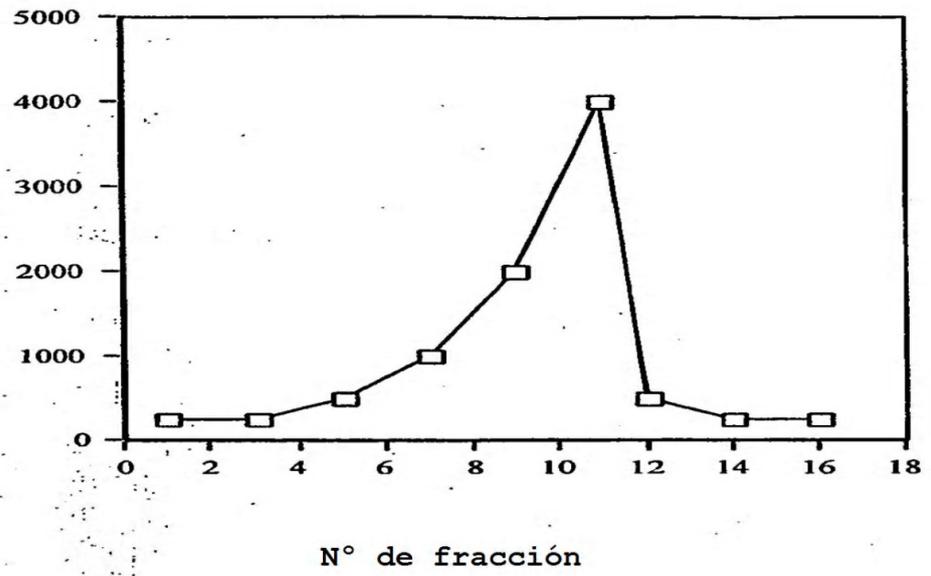


Figura 9

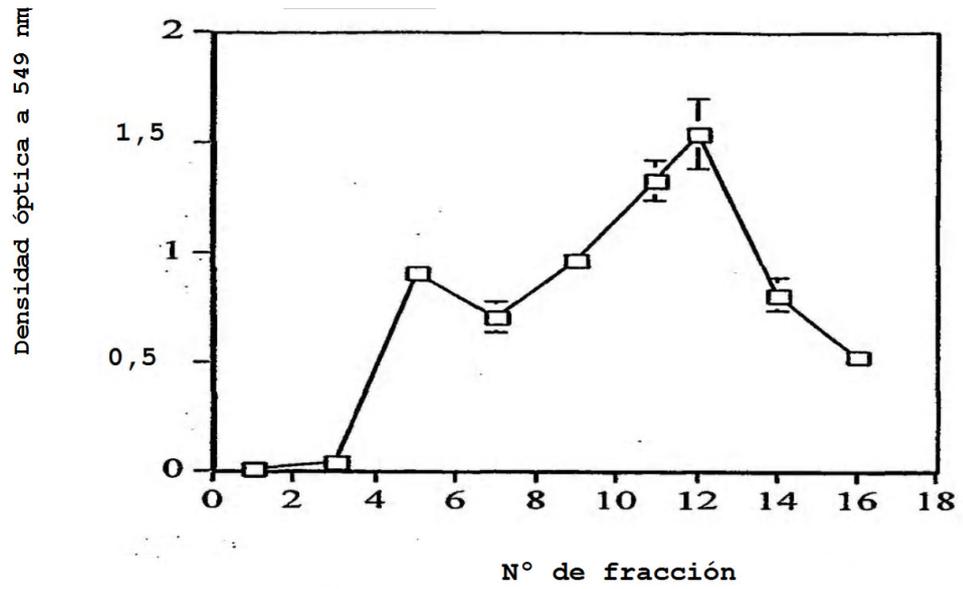


Figura 10

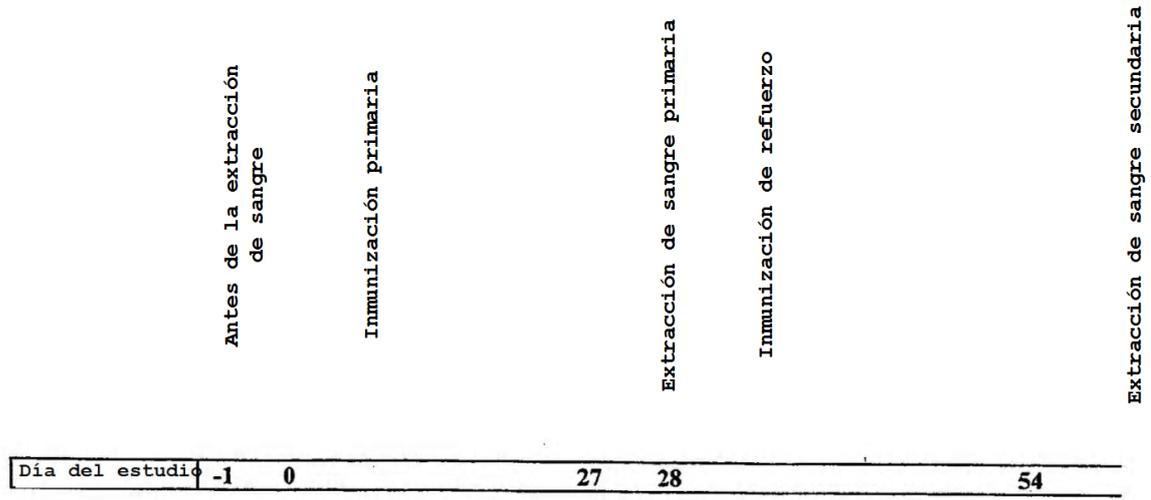


Figura 11

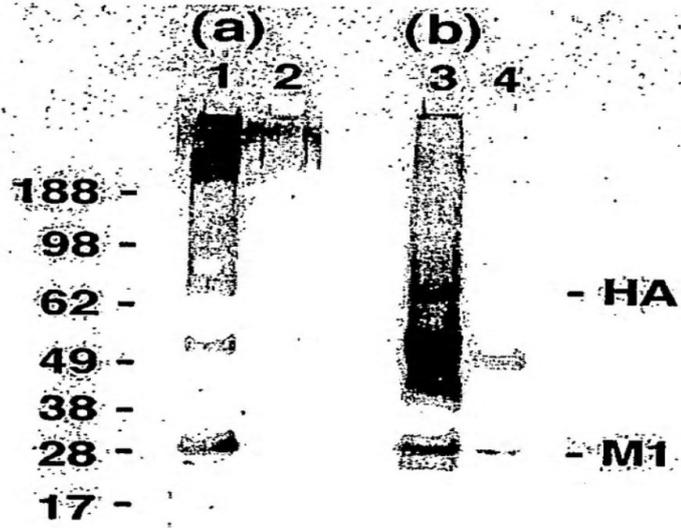


Figura 12

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0200885 A [0011]
- US 4911928 A [0020]
- US 10617569 B [0075]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- BERGLUND, P. ; FLEETON, M. N. ; SMERDOU, C. ; LILJESTROM, P. Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine*, 1999, vol. 17, 497-507 [0073]
- COX, J. C. ; COULTER, A. R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 1997, vol. 15, 248-256 [0073]
- CRAWFORD, J. ; WILKINSON, B. ; VOSNESEN-SKY, A. ; SMITH, G. ; GARCIA, M. ; STONE, H. ; PERDUE, M. L. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine*, 1999, vol. 17, 2265-2274 [0073]
- CROWTHER RA ; KISELEV NA ; BOTTCHE B ; BERRIMAN JA ; BORISOVA GP ; OSE V ; PUMPENS P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 1994, vol. 17, 943-50 [0073]
- GOMEZ-PUERTAS, P. ; MENA, I. ; CASTILLO, M. ; VIVO, A. ; PEREZ-PASTRANA, E. ; PORTELA, A. Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virol.*, 1999, vol. 80, 1635-1645 [0073]
- JOHANSSON, B. E. Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine*, 1999, vol. 17, 2073-2080 [0073]
- LAKEY, D.L. ; TREANOR, J.J. ; BETTS, B.F. ; SMITH, G.E. ; THOMPSON, J. ; SANNELLA, E. ; REED, G. ; WILKINSON, B.E. ; WRIGHT, P.E. Recombinant baculovirus influenza A hemagglutinin vaccines are well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.*, 1996, vol. 174, 838-841 [0073]
- LATHAM, T. ; GALARZA, J. M. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, 6154-6165 [0073]
- MENA, I. ; VIVO, A. ; PEREZ, E. ; PORTELA, A. Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.*, 1996, vol. 70, 5016-5024 [0073]
- Orthomyxoviruses. MURPHY, B. R. ; WEBSTER, R. G. Virology. Lippincott-Raven, 1996, vol. 1, 1397-1445 [0073]
- NEUMANN, G. ; WATANABE, T. ; KAWAOKA, Y. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, 547-551 [0073]
- OLSEN, C. W. ; MCGREGOR, M. W. ; DYBDAHL-SISSOKO, N. ; SCHRAM, B. R. ; NELSON, K. M. ; LUNN, D. P. ; MACKLIN, M. D. ; SWAIN, W. F. Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine*, 1997, vol. 15, 1149-1156 [0073]
- PEIRIS, J. S. ; GUAN, Y. ; MARKWELL, D. ; GHOSE, P. ; WEBSTER, R. G. ; SHORTRIDGE, K. F. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southwestern China: potential for genetic reassortment?. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, 9679-9686 [0073]
- Artificial genes for chimeric virus-like particles. PUMPENS, P. ; GRENS, E. Artificial DNA. CRC Press, 2003, 249-327 [0073]
- PUSHKO, P. ; PARKER, M. ; LUDWIG, G. V. ; DAVIS, N. L. ; JOHNSTON, R. E. ; SMITH, J. F. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology*, 1997, vol. 239, 389-401 [0073]
- SLEPUSHKIN, V. A. ; KATZ, J. M. ; BLACK, R. A. ; GAMBLE, W. C. ; ROTA, P. A. ; COX, N. J. Protection of mice against influenza A virus challenged by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*, 1995, vol. 13, 1399-1402 [0073]

- **TREANOR, J. J. ; BETTS, R. F. ; SMITH, G. E. ; ANDERSON, E. L. ; HACKETT, C. S. ; WILKINSON, B. E. ; BELSHE, R. B. ; POWERS, D. C.** Evaluation of a recombinant hemagglutinin expressed in insect cells as an influenza vaccine in young and elderly adults. *J. Infect. Dis.*, 1996, vol. 173, 1467-1470 [0073]
- **TSUJI, M. et al.** Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 6907-6910 [0073]
- **ULMER, J. B. et al.** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993, vol. 259, 1745-1749 [0073]
- **ULMER, J. B. et al.** Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 5648-5653 [0073]
- **WATANABE, T. ; WATANABE, S. ; NEUMANN, G. ; KAWAOKA, Y.** Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, 767-773 [0073]
- **ZHOU, X. et al.** Generation of cytotoxic and humoral immune responses by non-replicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 3009-3013 [0073]