

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 797**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2010 E 10724585 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **04.01.2012 EP 2401384**

54 Título: **Genética inversa usando promotores no endógenos de pol I**

30 Prioridad:

**21.05.2009 US 216919 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.02.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DORMITZER, PHILIP;  
FRANTI, MICHAEL;  
SUPHAPHIPHAT, PIRADA;  
MASON, PETER;  
KEINER, BJOERN y  
CROTTA, STEPHANIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 394 797 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

Genética inversa usando promotores no endógenos de pol I

### **Campo técnico**

5 La presente invención pertenece al campo de la genética inversa. Además, se refiere a la fabricación de vacunas para proteger contra diversos virus.

### **Técnica anterior**

10 La genética inversa permite la expresión recombinante y manipulación de virus ARN en cultivo celular. Es una herramienta poderosa en virología y fabricación de vacunas porque permite la rápida producción de virus recombinantes (incluyendo recombinantes) y/o su mutación. El procedimiento implica transfectar células huésped con una o más construcciones de expresión que codifican el genoma viral y aislar el virus de las células de las células. Por ejemplo, las referencias 1, y 71 2, describen un procedimiento en el que se expresa el ARN genómico de la influenza en células caninas usando el promotor canino de pol I. Otras fuentes han informado de la expresión de ARN genómica de la influenza en células humanas usando el promotor humano de pol I.

15 El documento WO2004/078912 se refiere a un polinucleótido que muestra actividad promotora de la transcripción, vectores que contienen el polinucleótido y el uso de los mismos para la transcripción de secuencias de interés tal como la producción de virus ARN sin recubrimiento. La descripción también se refiere a células huésped preferiblemente de origen aviar, que contienen un polinucleótido o el vector.

20 Un inconveniente significativo de los procedimientos de la técnica anterior es que los promotores de pol I son altamente específicos de especie. Por ejemplo, se ha informado de que el promotor humano de pol I es activo solamente en células de primate [3], y asimismo que la expresión en células caninas requeriría el promotor canino de pol I. Por tanto, cuando un virus tiene que cultivarse en una línea celular para la cual no se ha caracterizado el promotor endógeno de pol I, es necesario usar dos tipos celulares diferentes para rescatar y cultivar el virus. Sin embargo, es deseable evitar el uso de múltiples líneas celulares ya que esto tiene la ventaja, por ejemplo, de que pueden evitarse las presiones competitivas de selección en cultivo. El uso de una única celular para todas las etapas de producción de vacuna también facilita la aprobación reguladora. Por tanto sigue existiendo la necesidad en la técnica de proporcionar procedimientos alternativos para poner en práctica la genética inversa.

### **Resumen de las realizaciones preferidas**

Los inventores han descubierto ahora sorprendentemente que es posible dirigir la expresión de un transgén en una célula huésped canina usando un promotor de primate de pol I.

30 En una realización, la invención proporciona una célula huésped canina que expresa un virus que comprende una o más construcciones de expresión que codifican una molécula de ARN viral en la que la expresión de una molécula de ARN a partir de la construcción o construcciones está controlada por un promotor de primate de pol I. Estas células huésped pueden usarse en sistemas de expresión de la invención.

35 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para producir un virus recombinante en el que el virus se produce usando una célula huésped de la invención.

40 La invención también proporciona un procedimiento para preparar un virus (por ejemplo, para su formulación en una vacuna), que comprende las etapas de (i) producir un virus recombinante usando una célula huésped de la invención, (ii) infectar un huésped de cultivo con el virus obtenido en la etapa (i), (iii) cultivar el huésped de cultivo de la etapa (ii) para producir virus; y (iv) purificar el virus obtenido en la etapa (iii). Para proporcionar un procedimiento para preparar una vacuna, el procedimiento después puede incluir la etapa adicional de (v) formular el virus en una vacuna.

45 Además del promotor o promotores no endógenos de pol I que se introducen como se ha analizado anteriormente, la célula huésped incluirá promotores endógenos de pol I. El promotor o promotores no endógenos de pol I dirigen la expresión de ARN no endógeno, en particular ARN viral, en la célula. La invención por tanto proporciona una célula que tiene al menos un promotor endógeno de pol I que controla la expresión de ARN endógeno y al menos un promotor no endógeno de pol I que controla la expresión de un ARN viral o el complemento del mismo.

### **Construcciones de expresión**

50 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que es posible dirigir la expresión de ARN en una célula usando un promotor de pol I de un organismo que está en un orden taxonómico diferente de la célula. Por tanto el promotor de pol I no es endógeno a un organismo del mismo orden taxonómico del que se obtiene la célula. El término "orden" se refiere a la clasificación taxonómica convencional, y ejemplos de órdenes son primates, roedores, carnívoros, marsupiales, cetáceos, etc. Los seres humanos y los chimpancés están en el mismo orden taxonómico (primates), pero los seres humanos y los perros están en diferentes órdenes (primates frente a carnívoros).

Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona una célula huésped canina que comprende una o más construcciones de expresión en la que la expresión de la molécula de ARN a partir de la construcción o construcciones está dirigida por un promotor de primate de pol I.

5 En una realización preferida, el promotor de pol I es un promotor humano y la célula huésped es una célula canina (tal como una célula MDCK). Esta realización se prefiere ya que el promotor humano de pol I está bien caracterizado y las células caninas a menudo se usan para la producción de vacunas.

Las construcciones de expresión usadas en la célula huésped pueden ser construcciones de expresión unidireccional o bidireccional. Cuando una célula huésped expresa más de un transgén (ya sea en la misma o en diferentes construcciones de expresión) es posible usar expresión unidireccional y/o bidireccional.

10 Las construcciones de expresión bidireccional contienen al menos dos promotores que dirigen la expresión en diferentes direcciones (es decir, tanto 5' a 3' como 3' a 5') desde la misma construcción. Al menos uno de los promotores es un promotor no endógeno de pol I como se analiza en este documento. Los dos promotores pueden unirse de forma funcional a diferentes cadenas del mismo ADN bicatenario. Preferiblemente, uno de los promotores es un promotor no endógeno de pol I y al menos uno de los otros promotores es un promotor de pol II. Estos es útil  
15 ya que el promotor de pol I puede usarse para expresar ARNc sin recubrir mientras que el promotor de pol II puede usarse para transcribir ARNm que puede traducirse posteriormente en proteína, permitiendo de este modo la expresión simultánea de ARN y proteína desde la misma construcción. El promotor de pol II puede ser endógeno o no endógeno. Cuando se usa más de una construcción de expresión dentro de un sistema de expresión, los promotores pueden ser una mezcla de promotores endógenos y no endógenos con la condición de que al menos  
20 uno de los promotores sea un promotor no endógeno de pol I que puede dirigir la expresión en la célula huésped.

La construcción de expresión normalmente incluirá una secuencia de terminación de la transcripción de ARN. La secuencia de terminación puede ser una secuencia de terminación endógena o una secuencia de terminación que no es endógena a la célula huésped. Las secuencias de terminación adecuadas serán evidentes para los especialistas en la técnica e incluirán, aunque sin limitación, la secuencia de terminación de la transcripción de la  
25 ARN polimerasa I, la secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II, y ribozimas. Además, las construcciones de expresión pueden contener una o más señales de poliadenilación para ARNm, particularmente en el extremo de un gen cuya expresión está controlada por un promotor de pol II.

Un sistema de expresión puede contener al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o al menos doce construcciones  
30 de expresión.

Una construcción de expresión puede ser un vector, tal como un plásmido u otra construcción episómica. Dichos vectores normalmente comprenderán al menos un origen de replicación bacteriano y/o eucariota. Además, el vector puede comprender un marcador de selección que permite la selección en células procariontas y/o eucariotas. Ejemplos de dichos marcadores de selección son genes que confieren resistencia a antibióticos, tales como  
35 ampicilina o kanamicina. El vector puede comprender adicionalmente uno o más sitios de clonación múltiple para facilitar la clonación de una secuencia de ADN.

Como alternativa, una construcción de expresión puede ser una construcción de expresión lineal. Dichas construcciones de expresión lineales normalmente no contendrán ninguna secuencia de amplificación y/o selección. Sin embargo, las construcciones lineales que comprenden dichas secuencias de amplificación y/o selección también  
40 pueden usarse en la presente invención. Un ejemplo de un procedimiento que usa dichas construcciones de expresión lineal para la expresión del virus de la influenza se describe en la referencia 4.

Las construcciones de expresión pueden generarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos se describieron, por ejemplo, en la referencia 5. Cuando la construcción de expresión es una construcción de expresión lineal, es posible linealizarla antes de la introducción en la célula huésped usando un  
45 único sitio de enzima de restricción. Como alternativa, es posible escindir la construcción de expresión de un vector usando al menos dos sitios de enzima de restricción. Además, también es posible obtener una construcción de expresión lineal amplificándola usando una técnica de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, por PCR).

Las construcciones de expresión pueden introducirse en células huésped usando cualquier técnica conocida para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las construcciones de expresión pueden introducirse en células huésped  
50 empleando electroporación, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato cálcico, liposomas, microinyección, o bombardeo de micropartículas.

Cuando el huésped de expresión es una célula canina, tal como una línea celular MDCK, las regiones codificantes de proteína pueden optimizarse para la expresión canina, por ejemplo, usando un promotor de un gen canino de tipo silvestre o de un virus canino, y/o que tiene un uso de codones más adecuado para células caninas que para células  
55 humanas. Por ejemplo, mientras que los genes humanos favorecen ligeramente UUC como codón para Phe (54 %), en células caninas la preferencia es más fuerte (59 %). Asimismo, mientras que no hay mayoría de presencia para codones Ile en células humanas, el 53 % de los codones caninos usan AUC para Ile. Los virus caninos, tales como parvovirus canino (un virus ADNmc) también pueden proporcionar una guía para la optimización de codones, por

ejemplo, el 95 % de los codones Phe en secuencias de parvovirus canino son UUU (frente al 41 % en el genoma canino), el 68 % de los codones Ile son AUU (frente al 32 %), el 46 % de los codones Val son GUU (frente al 14 %), el 72 % de los codones Pro son CCA (frente al 25 %), el 87 % de los codones Tyr son UAU (frente al 40 %), el 87 % de los codones His son CAU (frente al 39 %), el 92 % de los codones Gln son CAA (frente al 25 %), el 81 % de los codones Glu son GAA (frente al 40 %), el 94 % de los codones Cys son UGU (frente al 42 %), solamente el 1 % de los codones Ser son UCU (frente al 24 %), CCC no se usa nunca para Phe y UAG no se usa nunca como codón de parada. Por tanto, los genes que codifican proteína pueden hacerse más como genes cuya naturaleza ya se ha optimizado para la expresión en células caninas, facilitando de este modo la expresión.

### **Genética inversa**

10 Las construcciones de expresión y células huésped descritas anteriormente son particularmente adecuadas para producir cepas de virus recombinante a través de técnicas de genética inversa. Las técnicas pueden usarse para la producción de una amplia diversidad de virus ARN, incluyendo virus ARN de cadena positiva [6,7], virus ARN de cadena negativa [8,9] y virus ARN bicatenarios [10]. Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un virus recombinante en el que el virus se produce usando un sistema de expresión descrito anteriormente.

15 Los sistemas de genética inversa conocidos implican expresar moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseado (ARNv) a partir de promotores de pol I, promotores de ARN polimerasa bacteriana, promotores de polimerasa de bacteriófagos, etc. Además, cuando un virus requiere ciertas proteínas para formar un virus infeccioso, los sistemas también proporcionan estas proteínas, por ejemplo, el sistema comprende adicionalmente moléculas de ADN que codifican proteínas virales de modo que la expresión de ambos tipos de ADN conduce al ensamblaje de un virus infeccioso completo.

20 Cuando se usa genética inversa para la expresión de ARNv, será evidente para los especialistas en la técnica que el espaciado preciso de los elementos de secuencia con referencia los unos de los otros es esencial para que la polimerasa inicie la replicación. Por lo tanto es importante que la molécula de ADN que codifica el ARN viral esté posicionada correctamente entre el promotor de pol I y la secuencia de terminación, pero este posicionamiento pertenece a las capacidades de aquellos que trabajan con los sistemas de genética inversa.

25 Generalmente, la genética inversa es adecuada para la expresión de cualquier virus que se sepa que requiera la producción de ARN genómico durante su ciclo vital. Dichos virus incluyen, aunque sin limitación, virus ARN de cadena positiva y cadena negativa, tales como los descritos a continuación. Preferiblemente, el virus es un ortomixovirus, por ejemplo, un virus de la influenza. Los procedimientos de la invención son adecuados adicionalmente para virus tanto no segmentados como segmentados.

30 Cuando el virus es un virus ARN de cadena positiva a menudo es suficiente transfectar una célula con una construcción de expresión que comprende el genoma viral. Por ejemplo, la transfección de plásmidos que contienen el genoma de poliovirus provocó la recuperación de poliovirus infeccioso [6,7]. La genética inversa para virus ARN de cadena negativa a presentado más retos ya que el ARN viral antisentido habitualmente es no infeccioso y requiere una ARN polimerasa para completar el ciclo vital. Por tanto, la polimerasa viral puede suministrarse, como proteína o como gen para la expresión de proteína *in situ*.

35 Cuando el virus requiere una proteína para su infectividad, generalmente se prefiere usar construcciones de expresión bidireccionales ya que esto reduce la cantidad total de construcciones de expresión necesarias por la célula huésped. Por tanto, el procedimiento de la invención puede usar al menos una construcción de expresión bidireccional en la que un gen o ADNc está localizado entre un promotor de pol II cadena arriba y un promotor no endógeno de pol I cadena abajo. La transcripción del gen o ADNc a partir del promotor de pol II produce ARNm viral con sentido positivo recubierto que puede traducirse en una proteína, mientras que la transcripción a partir del promotor no endógeno de pol I produce ARNv con sentido negativo. La construcción de expresión bidireccional puede ser un vector de expresión bidireccional.

40 Para producir un virus recombinante, una célula debe expresar todos los segmentos del genoma viral que son necesarios para ensamblar un virión. El ADN clonado en las construcciones de expresión usadas en la presente invención preferiblemente proporciona todo el ARN y proteínas virales, pero también es posible usar un virus auxiliar para proporcionar algo del ARN y las proteínas, aunque se prefieren sistemas que no usan un virus auxiliar. Cuando el virus es un virus no segmentado, esto puede conseguirse habitualmente usando una única construcción de expresión en el procedimiento de la invención, aunque también pertenece al alcance de la invención expresar el genoma viral de virus no segmentados usando más de una construcción de expresión. Cuando el virus es un virus segmentado, el genoma viral se expresa habitualmente usando más de una construcción de expresión en el procedimiento de la invención. Sin embargo, también se prevé combinar uno o más segmentos o incluso todos los segmentos del genoma viral en una única construcción de expresión.

45 Los procedimientos de la invención son particularmente adecuados para la producción de cepas víricas recombinantes. La técnica puede usar manipulación *in vitro* de plásmidos para generar combinaciones de segmentos virales, para facilitar la manipulación de secuencias codificantes y no codificantes en los segmentos

virales, para introducir mutaciones, etc. El uso del sistema de expresión para la producción de cepas víricas recombinantes se prefiere ya que esto puede disminuir significativamente el tiempo necesario para obtener un virus semilla recombinante que es particularmente beneficioso en situaciones en que se necesita una producción rápida de vacuna para contrarrestar una epidemia. Por tanto, se prefiere que el procedimiento de este aspecto de la invención use una o más construcciones de expresión que expresen genes virales a partir de u obtenidos de al menos dos cepas diferentes de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, también se incluirá una construcción de expresión que conduce a la expresión de una proteína accesoria en la célula huésped. Por ejemplo, puede ser ventajoso expresar una serín proteasa no vírica (por ejemplo, tripsina) como parte de un sistema de genética inversa.

10 Cuando las construcciones de expresión se usan para la expresión de segmentos virales de la influenza A, es posible generar la construcción de expresión introduciendo el segmento viral de la influenza A en una construcción de expresión que comprende un marcador de selección negativo (por ejemplo, *ccdB*) y los extremos altamente conservados del gen del virus de la influenza A [11]. La ventaja de esto es que no se requieren sitios de restricción y que puede clonarse cualquier segmento viral de la influenza A con la condición de que tenga extremos que sean complementarios a los extremos del gen en la construcción de expresión.

### **Células**

La invención usará normalmente una línea celular canina aunque, por ejemplo, pueden usarse células primarias caninas como alternativa. Pueden usarse diversos tipos celulares, tales como células renales, fibroblastos, células retinales, células pulmonares, etc. Células de perro adecuadas son, por ejemplo, células renales, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

Las células adecuadas están ampliamente disponibles, por ejemplo, en la colección de la American Type Cell Culture (ATCC) [16], de la Coriell Cell Repositories [17], o de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra células MDCK con el número de catálogo CCL 34.

25 Las células preferidas (particularmente para cultivar virus de la influenza) para su uso en la invención son células MDCK [18-20], derivadas de riñón canino Madin Darby. Las células MDCK originales están disponibles en la ATCC como CCL 34. Se prefiere usar derivados de estas células u otras células MDCK. Dichos derivados se describieron, por ejemplo, en la referencia 18 que describe células MDCK que se adaptaron para su crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016' o '33016-PF', depositadas como DSM ACC 2219; véase también la referencia 18). Además, la referencia 21 describe células derivadas de MDCK que crecen en suspensión en cultivos sin suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449). En algunas realizaciones, la línea celular MDCK usada puede ser tumorigénica. También se prevé usar células MDCK no tumorigénicas. Por ejemplo, la referencia 22 describe células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (ATCC PTA-6503). La referencia 23 describe células MDCK con altas susceptibilidad a infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL 12042).

35 Es posible usar una mezcla de más de un tipo celular para poner en práctica los procedimientos de la presente invención. Sin embargo, se prefiere que los procedimientos de la invención se pongan en práctica con un único tipo celular, por ejemplo, con células monoclonales. Preferiblemente, las células usadas en los procedimientos de la presente invención son de una única línea celular. Además, puede usarse la misma línea celular para rescatar el virus y para cualquier propagación posterior del virus.

40 Preferiblemente, las células se cultivan en ausencia de suero, para evitar una fuente común de contaminantes. Los especialistas en la técnica conocen diversos medios sin suero para el cultivo de células eucariotas (por ejemplo, medio de Iscove, medio ultra CHO (BioWhittaker), EX-CELL (JRH Biosciences)). Además, pueden usarse medios sin proteínas (por ejemplo, PF-CHO (JRH Bioscience)). Por lo demás, las células para replicación también pueden cultivarse en el medio que contiene suero habitual (por ejemplo, medio MEM o DMEM con un 0,5 % a un 10 % de suero fetal de ternera).

Las células pueden estar en cultivo adherente o en suspensión.

### **Exploración de líneas celulares caninas adecuadas**

50 Las células adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención están ampliamente disponibles. Además, es posible explorar células caninas adicionales usando técnicas habitualmente conocidas en la técnica. La exploración de células adecuadas puede ser necesaria, por ejemplo, cuando se identifica un nuevo promotor de pol I y cuando es deseable encontrar líneas celulares que soportarán la expresión por el nuevo promotor. Asimismo, cuando se aísla una nueva célula, puede ser necesario confirmar que los promotores de pol I pueden dirigir la expresión en la misma.

55 Las técnicas adecuadas para explorar células serán evidentes para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, puede clonarse un gen informador bajo el control del promotor de pol I de interés y la construcción puede introducirse por transfección en la línea celular que tiene que explorarse. En dichos experimentos, las células

transfectadas con una construcción que contiene el gen informador pero carece de una secuencia promotora pueden usarse como control. Por tanto, cuando la expresión del gen en una muestra de ensayo (por ejemplo, células que contienen un transgén bajo el control del promotor de pol I de interés) es significativamente mayor que la expresión en el control (por ejemplo, células que contienen el mismo transgén que la muestra de ensayo pero donde el transgén no contiene un promotor para dirigir la expresión del transgén), la línea celular es adecuada para su uso con ese promotor de acuerdo con la invención. La expresión del transgén puede medirse, por ejemplo, por transcripción inversa del ARN transgénico y sometiendo el ADNc obtenido a PCR a tiempo real. Como alternativa, también es posible clonar un gen informador (por ejemplo, GFP, YFP, luc, etc.) en dirección antisentido bajo el control del promotor de pol I. Un transcrito de dicha construcción puede entonces transcribirse en ARNm por una polimerasa viral y posteriormente traducirse en una proteína. Por tanto, cualquier célula que exprese el gen informador puede identificarse fácilmente por la presencia del producto génico informador.

Es posible además adaptar células en las que una pol I foránea normalmente no dirigiría la expresión para obtener células en las que el promotor de pol I pueda dirigir la expresión. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sometiendo las células a condiciones de cultivo que normalmente no serían adecuadas para las mismas. Por ejemplo, una línea celular que normalmente crecería solamente de forma adherente puede mantenerse de forma artificial en suspensión y las células que continúan creciendo en estas condiciones pueden propagarse adicionalmente. Como alternativa, es posible cultivar de forma adherente células que normalmente crecerían en suspensión, por ejemplo, usando recipientes de cultivo de plástico de alta unión o añadiendo suero al cultivo. Asimismo, es posible cultivar células que normalmente requieren suero para su crecimiento en condiciones sin suero o, a la inversa, exponer células que están adaptadas para el crecimiento sin suero al suero. Las células seleccionadas después pueden ensayarse para la actividad del promotor de pol I, como se ha descrito anteriormente. Parámetros de crecimiento adecuados adicionales que pueden alterarse de este modo serán evidentes para los especialistas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, la temperatura, pH, pO<sub>2</sub>, concentración sérica, etc. Además, las células pueden someterse a tratamientos físicos o químicos, tales como radiación UV o a mutágenos químicos. Asimismo, es posible explorar nuevas propiedades de las células que simplemente se han pasado en condiciones de cultivo normales.

Por ejemplo, la referencia 18 describe un procedimiento en el que se adaptaron células MDCK (habitualmente adherentes) al cultivo en suspensión en condiciones sin suero. Las células de partida se cultivaron en medio sin suero en frascos rotatorios en condiciones que se usan normalmente para cultivar células que crecen en suspensión. Después de varios pases en estas condiciones selectivas, se obtuvieron varias líneas celulares que podían crecer en suspensión en medio sin suero. Un ejemplo es la línea celular 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Los inventores han demostrado que un promotor humano de pol I puede dirigir la expresión de un gen informador en estas células MDCK.

### **Promotores de ARN polimerasa I**

La mayoría de los procedimientos de genética inversa usan vectores de expresión que comprenden un promotor de ARN polimerasa I (ARN pol I) para dirigir la transcripción del ARN genómico viral. El promotor de pol I da un transcrito con extremos 5' y 3' no modificados que es necesario para la completa infectividad de mucho virus, por ejemplo, la influenza.

Los promotores de pol I naturales son bipartitos, que tienen dos regiones separadas: el promotor central y el elemento de promotor cadena arriba (UPE). Aunque esta organización general es común a los promotores de pol I de la mayoría de las especies, sin embargo, las secuencias reales de los promotores varían ampliamente. El promotor central rodea el punto de partida de la transcripción, extendiéndose de aproximadamente -45 a +20, y suficiente para iniciar la transcripción. El promotor central es generalmente rico en GC. Aunque el promotor central solo es suficiente para iniciar la transcripción, la eficacia del promotor se aumenta mucho por el UPE. El UPE normalmente se extiende desde aproximadamente -180 a -107 y también es rico en GC. La actividad del promotor puede potenciarse adicionalmente por la presencia de secuencias tipo potenciador distales, que pueden funcionar estabilizando el complejo pre-inicio.

La secuencia del promotor de pol I se ha identificado en una diversidad de especies, incluyendo seres humanos, perros y pollos. La invención usa un promotor de primate de pol I.

Pueden usarse comparaciones de secuencia, *in silico* o experimentales, para confirmar en organismo del cual se obtiene cualquier promotor particular de pol I, por ejemplo, la Figura 10 muestra una alineación de los promotores canino y humano de pol hasta el sitio de inicio de la transcripción, con <60 % de identidad de secuencia.

Las construcciones de expresión incluyen al menos un promotor central; preferiblemente también incluyen al menos un UPE, y también pueden incluir uno o más elementos potenciadores. También es posible usar los fragmentos de promotores naturales, con la condición de que estos fragmentos puedan iniciar la transcripción. Por ejemplo, la Figura 3 muestra la secuencia del promotor canino de pol I de longitud completa (SEC ID N° 3) y diversos fragmentos que son suficientes para dirigir la expresión de un transgén (véase también la Figura 4 y las SEC ID N° 4 y 5). Además, la Figura 2 muestra la secuencia del promotor humano de pol I (SEC ID N° 1) y un fragmento del mismo que solo es suficiente para la expresión del transgén en la célula huésped (véase también la Figura 5 y la

SEC ID N° 2).

Un promotor humano de pol I que puede usarse de acuerdo con la invención puede comprender la secuencia de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, o una variante de las mismas. Cuando se usa un promotor canino de acuerdo con la invención, puede comprender la secuencia de las SEC ID N° 3, la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 5, o una variante de las mismas.

El promotor de pol I puede comprender (i) una secuencia que tiene al menos p % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID N° 1 a 5, y/o (ii) un fragmento cualquiera de las SEC ID N° 1 a 5, con la condición de que el promotor tenga la capacidad de iniciar y dirigir la transcripción de una secuencia codificante de ARN unida de forma funcional a una célula huésped de interés. El valor de p puede ser 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o más. El fragmento puede en sí mismo ser suficientemente largo para dirigir la expresión (por ejemplo, la SEC ID N° 4 es un fragmento de la SEC ID N° 3) o el fragmento puede unirse a otras secuencias y esta combinación dirigir a la expresión. La capacidad de dichos promotores de pol I de dirigir la expresión en una célula huésped de interés puede evaluarse fácilmente, por ejemplo, usando los ensayos descritos anteriormente con un gen informador antisentido bajo el control del promotor.

### 15 **Preparación de virus**

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un virus para la fabricación de vacunas, que comprende las etapas de (i) producir un virus recombinante como se describe en este documento, (ii) infectar un huésped de cultivo con el virus obtenido en la etapa (i), (iii) cultivar el huésped de la etapa (ii) para producir virus; (iv) purificar el virus obtenido en la etapa (iii) y (opcionalmente) (v) formular el virus en una vacuna.

Cuando se usan células como huésped de cultivo en este aspecto de la invención, se sabe que las condiciones de cultivo celular (por ejemplo, temperatura, densidad celular, valor de pH, etc.) son variables sobre un amplio intervalo sujeto a la línea celular y el virus empleado y pueden adaptarse a los requisitos de la aplicación. La siguiente información, por lo tanto, representa simplemente una directriz.

Como se ha mencionado anteriormente, las células se cultivan preferiblemente en medio sin suero o sin proteína.

La multiplicación de las células puede realizarse de acuerdo con procedimientos conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un sistema de perfusión usando procedimientos de soporte ordinarios como centrifugación o filtración. Además, las células pueden multiplicarse de acuerdo con la invención en un sistema semicontinuo antes de la infección. En el contexto de la presente invención, un sistema de cultivo se menciona como sistema semicontinuo en que las células se cultivan inicialmente en un sistema de lotes y la disminución de nutrientes (o parte de los nutrientes) en el medio se compensa por un suministro controlado de nutrientes concentrados. Puede ser ventajoso ajustar el valor de pH del medio durante la multiplicación de las células antes de la infección a un valor entre pH 6,6 y pH 7,8 y especialmente entre un valor entre pH 7,2 y pH 7,3. El cultivo de las células preferiblemente sucede a una temperatura entre 30 y 40 °C. En la etapa (iii), las células se cultivan preferiblemente a una temperatura entre 30 °C y 36 °C o entre 32 °C y 34 °C o a 33 °C. Esto es particularmente preferido cuando el procedimiento de la invención se usa para producir virus de la influenza, ya que se ha demostrado que la incubación de células infectadas en este intervalo de temperatura provoca la producción de un virus que produce eficacia mejorada cuando se formula en una vacuna [24].

La presión parcial de oxígeno puede ajustarse durante el cultivo antes de la infección preferiblemente a un valor entre el 25 % y el 95 % y especialmente a un valor entre el 35 % y el 60 %. Los valores para la presión parcial de oxígeno establecidos en el contexto de la invención se basan en la saturación de aire. La infección de las células sucede a una densidad celular de preferiblemente aproximadamente  $8\text{-}25 \times 10^5$  células/ml en el sistema de lotes o preferiblemente de aproximadamente  $5\text{-}20 \times 10^6$  células/ml en el sistema de perfusión. Las células pueden infectarse con una dosis viral (valor MOI, "multiplicidad de infección"; corresponde a la cantidad de unidades de virus por célula en el momento de la infección) entre  $10^{-8}$  y  $10$ , preferiblemente entre 0,0001 y 0,5.

Los virus pueden cultivarse en células en cultivo adherente o en suspensión. Pueden usarse cultivos microportadores. En algunas realizaciones, las células pueden por tanto adaptarse para su cultivo en suspensión.

Los procedimientos de acuerdo con la invención también incluyen recoger y aislar los virus o las proteínas generadas por los mismos. Durante el aislamiento de virus o proteínas, las células se separan del medio de cultivo por procedimientos convencionales como separación, filtración o ultrafiltración. Los virus o las proteínas después se concentran de acuerdo con procedimientos suficientemente conocidos para los especialistas en la técnica, como centrifugación en gradiente, filtración, precipitación, cromatografía, etc., y después se purifican. También se prefiere de acuerdo con la invención que los virus se inactiven durante o después de la purificación. La inactivación de virus puede suceder, por ejemplo, por  $\beta$ -propiolactona o formaldehído en cualquier punto en el procedimiento de purificación.

Los virus aislados en la etapa (i) también pueden cultivarse en huevos en la etapa (ii). El procedimiento convencional actual para el cultivo de virus de la influenza para vacunas usa huevos de gallina SPF embrionados, purificándose el

virus de los contenidos del huevo (fluido alantoideo). También es posible pasar un virus a través de huevos y posteriormente propagarlo en cultivo celular.

**Virus**

5 Los procedimientos de la invención pueden ponerse en práctica con cualquier virus que pueda expresarse por genética inversa en una célula. Dichos virus pueden ser virus segmentados o no segmentados. Además, el virus puede ser un virus ARN de cadena positiva o un virus de cadena negativa. En una realización adicional, el virus también puede ser un virus ARN bicatenario.

10 Cuando el virus es un virus ARN de cadena negativa, el virus puede ser de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en Paramixoviridae, Neumoviridae, Rabdoviridae, Filoviridae, Bornaviridae, Ortomixoviridae, Buniaviridae, o Arenaviridae. Además, el virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que  
 15 consiste en Paramixovirus, Ortomixovirus, Respirivirus, Morbilivirus, Rubulavirus, Henipavirus, Avulavirus, Peumovirus, Metapneumovirus, Vesiculovirus, Lisavirus, Efemerovirus, Citorabdovirus, Nucleorabdovirus, Novirabdovirus, Marburvirus, Ebolavirus, Bornavirus, Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus, Isavirus, Ortobuniavirus, Hantavirus, Nairovirus, Flebovirus, Tospovirus, Arenavirus, Ofiovirus, Tenuivirus, o Deltavirus. En realizaciones específicas el virus ARN de cadena negativa se selecciona entre el grupo que consiste en virus Sendai, virus del sarampión, virus de las paperas, virus Hendra, virus de la enfermedad de  
 20 Newcastle, virus sincitial respiratorio humano, neumovirus aviar, virus Indiana de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus de la fiebre efímera bovina, virus amarillo necrótico de la lechuga, virus de la patata amarilla enana, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, marburgvirus del Lago Victoria, ebolavirus de Zaire, virus de la enfermedad de Borna, virus de la influenza, virus Thogoto, virus de la anemia infecciosa del salmón, virus Bunyamwera, virus Hantaan, virus Dugbe, virus de la fiebre del Valle Rift, virus del bronceado del tomate, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de la soriasis de los cítricos, virus del bandeado del arroz, y virus de la hepatitis delta. En realizaciones preferidas, el virus es un virus de la influenza (véase a continuación).

25 Cuando el virus es un virus ARN de cadena positiva, el virus puede ser de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en Arteriviridae, Coronaviridae, Picornaviridae y Roniviridae. Además, el virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en Arterivirus, Coronavirus, Enterovirus, Torovirus, Okavirus, Rinovirus, Hepatovirus, Cardiovirus, Parecovirus, Erbovirus, Kobuvirus y Tescovirus. En realizaciones específicas el virus se selecciona entre el grupo que consiste en virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), virus de la polio, enterovirus humano A (HEV-A), enterovirus humano B (HEV-B), enterovirus humano C,  
 30 enterovirus humano D, virus de la hepatitis A y rinovirus humano A y B.

35 Cuando el virus es un virus ARN bicatenario, el virus puede ser de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en Birnaviridae, Cistoviridae, Hipoviridae, Partitiviridae, Reoviridae y Totiviridae. Además, el virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en Acuabirnavirus, Avibirnavirus, Entomobirnavirus, Cistovirus, Partitivirus, Alfacriptovirus, Betacriptovirus, Acuareovirus, Coltivirus, Cipovirus, Fijivirus, Idnoreovirus, Micoreovirus, Orbivirus, Ortoreovirus, Orizavirus, Fitoreovirus, Rotavirus y Seadornavirus.

La presente invención es particularmente adecuada para virus que experimentan rápida mutación y donde el enfoque recombinante permite un aislamiento más rápido del virus que puede después propagarse adicionalmente para obtener vacunas adecuadas. Por lo tanto, en una realización preferida el virus es influenza.

**Virus de la influenza**

40 Los virus de la influenza son particularmente adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención, particularmente virus de la influenza A y virus de la influenza B, ya que se ha caracterizado bien la genética inversa para este virus. Los virus de la influenza son virus ARN de cadena negativa segmentada. Los virus de la influenza A y B tienen ocho segmentos, mientras que el virus de la influenza C tiene siete. El virus requiere al menos cuatro proteínas virales (PB1, PB2, PA y nucleoproteína) para iniciar la replicación y la transcripción.

45 La genética inversa para los virus de la influenza A y B puede ponerse en práctica con 12 plásmidos para expresar las cuatro proteínas necesarias y los ocho segmentos genómicos. Para reducir la cantidad de construcciones, sin embargo, puede incluirse una pluralidad de casetes de transcripción de la ARN polimerasa I (para síntesis de ARN viral) en un único plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos de ARNv de la influenza), y una pluralidad de regiones que codifican proteína con promotores de la ARN polimerasa II en otro  
 50 plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 transcritos de ARNm de la influenza) [25]. También es posible incluir uno o más segmentos de ARNv de la influenza bajo el control de un promotor de pol I y una o más regiones codificantes de proteína de la influenza bajo el control de otro promotor, en particular un promotor de pol II, en el mismo plásmido. Como se ha descrito anteriormente, esto se hace preferiblemente usando plásmidos bidireccionales. Aspectos preferidos del procedimiento de la referencia 25 implican: (a) regiones  
 55 codificantes de ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos codificantes de ARNv en un único plásmido. Es particularmente preferido incluir los segmentos de la neuraminidasa (NA) y la hemaglutinina (HA) en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido ya que cepas del virus de la influenza recién



emergentes habitualmente tienen mutaciones en los segmentos de NA y/o HA. Por lo tanto, en esta realización, solamente tiene que remplazarse el vector que comprende la secuencia de HA y NA.

5 Los sistemas de expresión preferidos para virus de la influenza A codifican segmentos genómicos derivados de una pluralidad de diferentes cepas de tipo silvestre. El sistema puede codificar 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) segmentos genómicos de una cepa PR/8/34 (A/Puerto Rico/8/34), pero habitualmente éste o éstos no incluirán el segmento HA de PR/8/34 y habitualmente no incluirán el segmento NA de PR/8/34. Por tanto, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 (posiblemente los seis) de PR/8/34.

10 Otros sistemas de expresión útiles para virus de la influenza A pueden codificar 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) segmentos genómicos de un virus de la influenza AA/6/60 (A/Ann Arbor/6/60), pero habitualmente éste o éstos no incluirán el segmento HA de AA/6/60 y habitualmente no contendrán el segmento NA de AA/6/60. Por tanto, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 (posiblemente los seis) de AA/6/60.

15 El sistema puede codificar 1 o más segmentos genómicos de una cepa A/California/4/09, por ejemplo, el segmento HA y/o el segmento NA. Por tanto, por ejemplo, el segmento génico de HA puede codificar una hemaglutinina H1 que está más estrechamente relacionada con la SEC ID N° 6 que con la SEC ID N° 7 (es decir, tiene un mayor grado de identidad de secuencia cuando se compara con la SEC ID N° 6 que con la SEC ID N° 7 usando el mismo algoritmo y parámetros). Las SEC ID N° 6 y 7 son un 80 % idénticas. Asimismo, el gen NA puede codificar una neuraminidasa N1 que está más estrechamente relacionada con la SEC ID N° 8 que con la SEC ID N° 9. Las SEC ID N° 8 y 9 son un 82 % idénticas.

20 Los sistemas de expresión para virus de la influenza B pueden codificar segmentos genómicos derivados de una pluralidad de diferentes cepas de tipo silvestre. El sistema puede codificar 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) segmentos genómicos de un virus de la influenza AA/1/66 (B/Ann Arbor/1/66), pero habitualmente éste o éstos no incluirán el segmento HA de AA/1/66 y habitualmente no incluirían el segmento NA de AA/1/66. Por tanto, el sistema puede codificar al menos uno de los segmentos NP, M, NS, PA, PB1 y/o PB2 de AA/1/66.

25 Los segmentos y secuencias virales de las cepas A/PR/8/34, AA/6/60, AA/1/66, A/Chile/1/83 y A/California/04/09 están ampliamente disponibles. Sus secuencias están disponibles en las bases de datos públicas, por ejemplo, GI:89779337, GI:89779334, GI:89779332, GI:89779320, GI:89779327, GI:89779325, GI:89779322, GI:89779329.

30 Un sistema de genética inversa para el virus de la influenza puede incluir una construcción de expresión que conduce a la expresión de una proteína accesoria en la célula huésped. Por ejemplo, puede ser ventajoso expresar una serín proteasa no viral (por ejemplo, tripsina).

### **Vacuna**

El procedimiento del tercer aspecto de la invención usa un virus producido de acuerdo con el procedimiento para producir vacunas.

35 Las vacunas (particularmente para el virus de la influenza) generalmente se basan en virus vivo o en virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones 'divididos', o en antígenos superficiales purificados. Los antígenos también pueden presentarse en forma de virosomas. La invención puede usarse para fabricar cualquiera de estos tipos de vacuna.

40 Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender virión completo, virión dividido, o antígenos superficiales purificados (para la influenza, incluyendo hemaglutinina y, habitualmente, también incluyendo neuraminidasa). Los medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β-propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifulereo (C60), etilamina binaria, acetil etilenoimina, o combinaciones de los mismos. Se conocen en la técnica procedimientos no químicos de inactivación viral, tales como, por ejemplo, irradiación con luz UV o irradiación gamma.

45 Los viriones pueden recogerse de fluidos que contienen virus, por ejemplo fluido alantoideo o sobrenadante de cultivo celular, por diversos procedimientos. Por ejemplo, un procedimiento de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución con gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para alterar los viriones. Los antígenos después pueden purificarse, tras dilución opcional, por diafiltración.

50 Los viriones divididos se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones, incluyendo el procedimiento de división con 'Tween-éter'. Los procedimientos para dividir virus de la influenza, por ejemplo, son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse las ref. 26-31, etc. La división del virus se realiza normalmente alterando o fragmentando el virus completo, ya sea infeccioso o no infeccioso con una concentración alterante de agente de división. La alteración provoca la solubilización completa o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Los agentes de división preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglucósidos,

alquiltioglucoídos, azúcares de acilo, sulfobetaínas, betaínas, polioxietilenoalquiléteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, NP9, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTAB (bromuros de cetil trimetil amonio), fosfato de tri-N-butilo, Cetavlon, sales miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina, y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (por ejemplo, los tensioactivos Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietileno-sorbitán (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento de división útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato sódico y formaldehído, y la división puede tener lugar durante la purificación inicial del virión (por ejemplo, en una solución con gradiente de densidad de sacarosa). Por tanto, un procedimiento de división puede implicar el aclaramiento del material que contiene el virión (para retirar el material no de virión), la concentración de los viriones recogidos (por ejemplo, usando un procedimiento de adsorción, tal como adsorción en  $\text{CaHPO}_4$ ), separación de viriones completos a partir de material no de virión, división de viriones usando un agente de división en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de división tal como desoxicolato sódico), y después filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para retirar los materiales no deseados. Los viriones divididos pueden resuspenderse de forma útil en solución de cloruro sódico tamponada con fosfato sódico. Ejemplos de vacunas de la influenza divididas son los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™.

El procedimiento de la invención también puede usarse para producir vacunas vivas. Dichas vacunas se preparan habitualmente purificando viriones de fluidos que contienen virión. Por ejemplo, los fluidos pueden aclararse por centrifugación, y estabilizarse con tampón (por ejemplo, que contiene sacarosa, fosfato potásico, y glutamato monosódico). Están actualmente disponibles diversas formas de vacuna contra el virus de la influenza (por ejemplo, véanse los capítulos 17 y 18 de la referencia 32). Las vacunas de virus vivo incluyen el producto FLUMIST™ de MedImmune (vacuna de virus vivo trivalente).

Las vacunas de antígeno superficial del virus de la influenza purificado comprenden los antígenos superficiales hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa. Los procedimientos para preparar estas proteínas en forma purificada son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son vacunas de subunidad de la influenza.

Otra forma de antígeno inactivado es el virosoma [33] (ácido nucleico libre de partículas lisosomales tipo virales). Los virosomas pueden prepararse por solubilización de virus con un detergente seguido de la eliminación de la nucleocápsida y reconstitución de la membrana que contiene las glucoproteínas virales. Un procedimiento alternativo para preparar virosomas implica añadir glucoproteínas de membrana viral a cantidades en exceso de fosfolípidos, para dar liposomas con proteínas viral en su membrana.

El virus puede estar atenuarse. El virus puede ser sensible a temperatura. El virus puede estar adaptado al frío. Estas tres características son particularmente útiles cuando se usa virus vivo como antígeno.

La HA es el inmunógeno principal en las actuales vacunas inactivadas de la influenza, y las dosis de vacuna se normalizan por referencia a los niveles de HA, normalmente medidos por SRID. Las vacunas existentes normalmente contienen aproximadamente 15  $\mu\text{g}$  de HA por cepa, aunque pueden usarse dosis inferiores por ejemplo para niños, o en situaciones pandémicas, o cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionarias tales como  $\frac{1}{2}$  (es decir, 7,5  $\mu\text{g}$  de HA por cepa),  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{8}$ , así como superiores (por ejemplo, dosis 3x o 9x [34, 35]). Por tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150  $\mu\text{g}$  de HA por cepa de influenza, preferiblemente entre 0,1 y 50  $\mu\text{g}$ , por ejemplo, 0,1-20  $\mu\text{g}$ , 0,1-15  $\mu\text{g}$ , 0,1-10  $\mu\text{g}$ , 0,1-7,5  $\mu\text{g}$ , 0,5-5  $\mu\text{g}$ , etc. Dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa. Para vacunas vivas, la dosificación se mide por la dosis infecciosa de cultivo tisular media ( $\text{DICT}_{50}$ ) en lugar del contenido en HA, y es típica una  $\text{DICT}_{50}$  entre  $10^6$  y  $10^8$  (preferiblemente entre  $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ ) por cepa.

Las cepas de la influenza usadas con la invención pueden tener una HA natural como la encontrada en un virus de tipo silvestre, o una HA modificada. Por ejemplo, se sabe modificar HA para retirar determinantes (por ejemplo, regiones hiper-básicas alrededor del sitio de escisión HA1/HA2) que causan que un virus sea altamente patogénico en especies aviares. El uso de la genética inversa facilita dichas modificaciones.

Las cepas del virus de la influenza para su uso en vacunas cambian de una temporada a otra. En periodos inter-pandémicos, las vacunas normalmente incluyen dos cepas de la influenza A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la influenza B, y son típicas las vacunas trivalentes. La invención también puede usar cepas virales pandémicas (es decir, cepas en las que los destinatarios de la vacuna y la población humana general son inmunológicas vírgenes, en particular del virus de la influenza A), tales como las cepas de subtipo H2, H5, H7 o H9, y las vacunas de la influenza para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden basarse en una vacuna trivalente normal suplementada por una cepa pandémica. Dependiendo de la temporada y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, sin embargo, la invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H 13, H 14, H15 o H16. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de NA del virus de la influenza A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

Además de ser adecuadas para inmunizar contra cepas inter-pandémicas, las composiciones son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas o potencialmente pandémicas. Las características de una cepa de la influenza que le da potencial para causar un brote pandémico son: (a) contiene una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en cepas humanas actualmente en circulación, es decir, una que no ha sido evidente en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2), o no se ha observado previamente para nada en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que se han encontrado generalmente en poblaciones de pájaros), de modo que la población humana será inmunológicamente virgen a la hemaglutinina de la cepa; (b) es capaz de transmitirse de forma horizontal en la población humana; y (c) es patogénica para seres humanos. Un virus con el tipo de hemaglutinina H5 se prefiere para inmunizar contra influenza pandémica, tal como una cepa H5N1. Otras posibles cepas incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa emergente potencialmente pandémica. La invención es particularmente adecuada para proteger contra cepas virales pandémicas potenciales que pueden o se han propagado desde una población animal no humana a seres humanos, por ejemplo una cepa de la influenza H1N1 con origen en cerdos. La invención entonces es adecuada para vacunar a seres humanos así como a animales no humanos.

Otras cepas cuyos antígenos pueden incluirse de forma útil en las composiciones son cepas que son resistentes a terapia antiviral (por ejemplo, resistentes a oseltamivir [36] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [37].

Las composiciones pueden incluir uno o más antígenos de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la influenza, incluyendo el virus de la influenza A y/o el virus de la influenza B. Cuando una vacuna incluye más de una cepa de influenza, las diferentes cepas se cultivan normalmente por separado y se mezclan después de que los virus se hayan recogido y se hayan preparado los antígenos. Por tanto, un procedimiento de la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la influenza. Una vacuna trivalente es típica, que incluye antígenos de dos cepas del virus de la influenza A y una cepa del virus de la influenza B. También es útil una vacuna tetravalente [38], que incluye antígenos de dos cepas del virus de la influenza A y dos cepas del virus de la influenza B, o tres cepas del virus de la influenza A y una cepa del virus de la influenza B.

#### **Composiciones farmacéuticas**

Las composiciones de vacuna fabricadas de acuerdo con la invención son farmacéuticamente aceptables. Habitualmente incluyen componentes además de los antígenos, por ejemplo, normalmente incluyen uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Como se describe a continuación, también pueden incluir adyuvantes. Está disponible un análisis minucioso de dichos componentes en la referencia 39.

Las composiciones de vacuna generalmente estarán en forma acuosa. Sin embargo, algunas vacunas pueden estar en forma seca, por ejemplo, en forma de sólidos inyectables o preparaciones secadas o polimerizadas en un parche.

Las composiciones de vacuna pueden incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [30,40]. Son más preferidas las vacunas que no contienen mercurio. Puede incluirse succinato de α-tocoferol como alternativa a los compuestos mercuriales [30]. Son particularmente preferidas las vacunas libres de conservantes.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal sodio. Se prefiere el cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrogenofosfato potásico, fosfato disódico deshidrato, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones de vacuna generalmente tendrán una osmolalidad entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente estará en el intervalo de 290-310 mOsm/kg. Se ha informado previamente de que la osmolalidad no tiene impacto sobre el dolor causado por la vacunación [41], pero no obstante se prefiere mantener la osmolalidad en este intervalo.

Las composiciones de vacuna pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones normalmente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición de vacuna generalmente estará entre 5,0 y 8,1, y más normalmente entre 6,0 y 8,0 por ejemplo 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Un procedimiento de la invención, por lo tanto, puede incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna a granel antes del envasado.

La composición de vacuna es preferiblemente estéril. La composición de vacuna es preferiblemente no pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferiblemente <0,1 UE por dosis. La composición de vacuna está preferiblemente libre de gluten.

Las composiciones de vacuna pueden incluir detergente, por ejemplo, un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán (conocidos como 'Tween'), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un

bromuro de cetil trimetil amonio ('CTAB'), o desoxicolato sódico, particularmente para una vacuna dividida o de antígeno superficial. El detergente puede estar presente solamente en cantidades traza. Por tanto, la vacuna puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10 y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades traza podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

- 5 Una composición de vacuna puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis'). Se prefiere la inclusión de un conservante en disposiciones multidosis. Como alternativa (o adicionalmente) a incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la retirada de material.
- 10 Las vacunas de la influenza normalmente se administran en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse una media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a niños.

Las composiciones y kits se almacenan preferiblemente a entre 2 °C y 8 °C. No deben congelarse. Deben mantenerse de forma ideal lejos de la luz directa.

**ADN de la célula huésped**

- 15 Cuando se ha aislado y/o cultivado el virus en una línea celular, la práctica convencional es minimizar la cantidad de ADN residual de la línea celular en la vacuna final, para minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN.
- Por tanto, una composición de vacuna preparada de acuerdo con la invención preferiblemente contiene menos de 10 ng (preferiblemente menos de 1 ng, y más preferiblemente menos de 100 pg) de ADN residual de la célula huésped por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades traza del ADN de la célula huésped.
- 20 Se prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN residual de la célula huésped sea de menos de 500 pb, por ejemplo, menos de 400 pb, menos de 300 pb, menos de 200 pb, menos de 100 pb, etc.

- El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos convencionales de purificación, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación del ADN residual de la célula huésped puede potenciarse por tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una DNasa. Un procedimiento conveniente para reducir la contaminación con ADN de la célula huésped se describe en las referencias 42 y 43, que implica un tratamiento de dos etapas, primero usando una DNasa (por ejemplo, Benzonasa), que puede usarse durante el crecimiento viral, y después un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede usarse durante la alteración del virión. También puede usarse tratamiento con un agente alquilante, tales como β-propiolactona, para eliminar el ADN de la célula huésped, y ventajosamente también puede usarse para inactivar viriones [44].
- 25

30 **Adyuvantes**

- Las composiciones pueden incluir ventajosamente un adyuvante, que puede funcionar potenciando las respuestas inmunes (humoral y/o celular) provocadas en un sujeto que recibe la composición. Los adyuvantes preferidos comprenden emulsiones de aceite-en-agua. Son conocidos diversos de dichos adyuvantes, y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite o aceites y el tensioactivo o tensioactivos biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión generalmente son de menos de 5 μm de diámetro, e idealmente tienen un diámetro sub-micrométrico, consiguiéndose estos pequeños tamaño con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotas con un tamaño menos de 220 nm ya que pueden someterse a esterilización en filtro.
- 35
- La emulsión puede comprender aceites tales como los de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Las fuentes para aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco, y el aceite de oliva, los más habitualmente disponibles, ejemplifican los aceites de nuez. El aceite de jojoba puede usarse, por ejemplo, obtenido de la judía de jojoba. Los aceites de semilla incluyen aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos de cereal tales como maíz, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Pueden prepararse ésteres de ácido graso de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no existen de forma natural en los aceites de semilla, por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de nuez y semilla. Las grasas y los aceites de leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao o los aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como espermaceti, ejemplifican varios de los aceites de este tipo que pueden usarse en este documento. Se sintetizan bioquímicamente varios aceites de cadena ramificada en unidades isopreno de 5-carbonos y se mencionan generalmente como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocido como escualeno, el 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en este documento. El escualeno, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles en
- 40
- 45
- 50
- 55

fuentes comerciales o pueden obtenerse por procedimientos conocidos en la técnica. Otro aceite preferido es  $\alpha$ -tocoferol (véase a continuación).

Pueden usarse mezclas de aceites.

5 Los tensioactivos pueden clasificarse por su 'HLB' (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15, y más preferiblemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, aunque sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (habitualmente mencionados como Tween), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), vendidos con la marca DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque lineales de EO/PO; octoxinolos, que pueden variar en la cantidad de grupos etoxi repetitivos (oxi-1,2-etanodiol), siendo el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres de polioxietileno graso derivados de alcoholes laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (habitualmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren tensioactivos no iónicos. Tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

25 Cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tal como Tween 80) del 0,01 al 1 %, en particular a aproximadamente el 0,1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanolos (tal como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) del 0,1 al 20 %, preferiblemente del 0,1 al 10 % y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente al 0,5 %.

Quando la vacuna contiene un virus dividido, se prefiere que contenga tensioactivo libre en la fase acuosa. Esto es ventajoso ya que el tensioactivo libre puede ejercer un 'efecto de división' sobre el antígeno, alterando de este modo cualquier virión no dividido y/o agregados de viriones que pudieran estar de otro modo presentes. Esto puede mejorar la seguridad de las vacunas de virus dividido [45].

30 Las emulsiones preferidas tienen un tamaño de gota promedio de <1  $\mu\text{m}$ , por ejemplo,  $\leq 750$  nm,  $\leq 500$  nm,  $\leq 400$  nm,  $\leq 300$  nm,  $\leq 250$  nm,  $\leq 220$  nm,  $\leq 200$  nm, o más pequeño. Estos tamaños de gota pueden conseguirse convenientemente por técnicas tales como microfluidización.

Los adyuvantes específicos de aceite-en-agua útiles con la invención incluyen, aunque sin limitación:

- 35 • Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en el 4,3 % de escualeno, el 0,5 % de polisorbato 80 y el 0,48 % de Span 85. Este adyuvante es conocido como 'MF59' [46-48], como se describe en más detalle en el capítulo 10 de la ref. 49 y el capítulo 12 de la ref. 50. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato sódico 10 mM.
- 40 • Una emulsión de escualeno, DL- $\alpha$ -tocoferol, y polisorbato 80 (Tween 80). La emulsión puede incluir una solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de Tween 80, y la proporción en peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente  $\leq 1$  ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una proporción en volumen de aproximadamente 5:2 o a una proporción en peso de aproximadamente 11:5. Una de dicha emulsión puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución al 2 %, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir a monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol, y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [51].
- 45 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- 50 • Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de  $\alpha$ -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una proporción de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de polisorbato
- 55

80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de succinato de  $\alpha$ -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes a partir de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

- 5 • Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión pueden formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de suministro útil para muramil dipéptidos, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [52] (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualano, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). También puede usarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [53] (5 % de escualano, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.
- 10 • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxietileno alquil éter (por ejemplo, polioxietileno (12) éter cetosteárico) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de mannida, tal como monooleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión se preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño menor de 200 nm [54]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioconservante (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [55]. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.
- 15 • Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [56]. La concentración final (peso) de estos componentes en vacunas adyuvantadas son del 5 % de escualeno, el 4 % de poloxámero 105 (poliol pluronic) y el 2 % de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).
- 20 • Una emulsión que tiene el 0,5-50 % de un aceite, el 0,1-10 % de un fosfolípido, y el 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 57, componentes fosfolipídicos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos tamaños de gota submicrométricos.
- 25 • Una emulsión submicrométrica de aceite-en-agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 58, producido por la adición de amina alifática a la desacilsaponina mediante el grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-diocta-decil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.
- 30 • Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) se asocian en micelas helicoides [59].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [60].
- 35 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [60].

En algunas realizaciones, puede mezclarse una emulsión con el antígeno de forma improvisada, en el momento del suministro, y por tanto el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para su formulación final en el momento de su uso. En otras realizaciones se mezcla una emulsión con el antígeno durante la fabricación, y por tanto la composición se envasa en una forma líquida adyuvantada. El antígeno generalmente estará en una forma acuosa, de modo que la vacuna se prepare finalmente mezclando los dos líquidos. La proporción en volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero es generalmente de aproximadamente 1:1. Cuando las concentraciones de los componentes se dan en las descripciones antiheroes de emulsiones específicas, estas concentraciones son normalmente para una composición no diluida, y de este modo disminuirá la concentración después de la mezcla con una solución antígeno.

#### **Envasado de las composiciones de vacuna**

Recipientes adecuados para las composiciones (o componentes de kit) incluyen viales, jeringas (por ejemplo, jeringas desechables), pulverizaciones nasales, etc. Estos recipientes deben ser estériles.

50 Cuando una composición/componente está localizada en un vial, el vial está hecho preferiblemente de un material de vidrio o plástico. El vial se esteriliza preferiblemente antes de que la composición se añada al mismo. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tampón sin látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de envasado. El vial puede incluir una única dosis de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial 'multidosis') por ejemplo 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

Un vial puede tener un tapón (por ejemplo, un cierre Luer) adaptado de tal modo que pueda insertarse una jeringa pre-cargada en el tapón, los contenidos de la jeringa puedan expulsarse dentro del vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en su interior), y los contenidos del vial pueden retirarse de nuevo al interior de la jeringa. Después de retirar la jeringa del vial, pueden entonces unirse una aguja y la composición puede administrarse a un paciente. El tapón está preferiblemente localizado en el interior de un precinto o cubierta, de modo que el precinto o cubierta tiene que retirarse antes de poder acceder al tapón. Un vial puede tener un tapón que permita la retirada aséptica de sus contenidos, particularmente para viales multidosis.

Cuando un componente se envasa en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a la misma. Si no se une una aguja, puede suministrarse una aguja separada con la jeringa para su ensamblaje y uso. Dicha aguja puede estar enfundada. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas agujas de 2,54 cm (1-pulgada) de calibre 23, de 2,54 cm (1-pulgada) de calibre 25 y de 1,59 cm (5/8-pulgadas) de calibre 25. Las jeringas pueden proporcionarse con etiquetas que se pueden retirar en las que puede estar impreso el número de lote, la temporada de influenza y la fecha de caducidad de los contenidos, para facilitar el mantenimiento de un registro. El émbolo en la jeringa preferiblemente tiene un tope para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un tapón y/o émbolo de goma de látex. Las jeringas desechables contienen una única dosis de vacuna. La jeringa generalmente tendrá un tapón en la punta para sellar la punta antes de unir una aguja, y el tapón de la punta está hecho preferiblemente de una goma de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado entonces la aguja se equipa preferiblemente con una protección de goma de butilo. Las jeringas preferidas son aquellas comercializadas con la marca "Tip-Lok"™.

Los recipientes pueden estar marcados para mostrar el volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar el suministro a niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.

Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio sodocálcico.

Puede envasarse un kit o composición (por ejemplo, en la misma caja) con un prospecto que incluye los detalles de la vacuna, por ejemplo, instrucciones para su administración, detalles de los antígeno en la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, por ejemplo, para mantener una solución de adrenalina disponible en caso de reacción anafiláctica después de la vacunación, etc.

### ***Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna***

La descripción proporciona una vacuna fabricada de acuerdo con la invención. Estas composiciones de vacuna son adecuadas para su administración a sujetos humanos o sujetos animales no humanos, tales como cerdos, y la invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al sujeto. La descripción también proporciona una composición para su uso como medicamento, y proporciona el uso de una composición para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un sujeto.

La respuesta inmune producida por estos procedimientos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta protectora de anticuerpos. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos, capacidad neutralizante y protección después de una vacuna con virus de la influenza son bien conocidos en la técnica. Estudios en seres humanos han demostrado que los títulos de anticuerpos contra hemaglutinina del virus de la influenza humana están correlacionados con protección (un título de inhibición de hemaglutinación en muestra sérica de aproximadamente 30-40 da aproximadamente un 50 % de protección contra infección por un virus homólogo) [61]. Las respuestas de anticuerpo normalmente se miden por inhibición de hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial sencilla (SRID), y/o por hemólisis radial sencilla (SRH). Estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

Las composiciones pueden administrarse de diversos modos. La vía de administración más preferida es por inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [62-64], oral [65], intradérmica [66, 67], transcutánea, transdérmica [68], etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Las vacunas de la influenza están actualmente recomendadas para su uso en inmunización pediátrica y en adultos, a partir de una edad de 6 meses. Por tanto, un sujeto humano puede ser de menos de 1 año de edad, de 1-5 años de edad, de 5-15 años de edad, de 15-55 años de edad, o de al menos 55 años de edad. Los sujetos preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo,  $\geq 50$  años de edad,  $\geq 60$  años de edad, y preferiblemente  $\geq 65$  años de edad), los jóvenes (por ejemplo,  $\leq 5$  años de edad), sujetos hospitalizados, trabajadores sanitarios, personal del servicio armado y militar, mujeres embarazadas, los enfermos crónicos, sujetos inmunodeficientes, sujetos que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto oseltamivir o zanamivir; véase a continuación) en los 7 días previos a recibir la vacuna, personas con alergias al huevo y gente que viaja al extranjero. Las vacunas no son adecuadas solamente para estos grupos, sin embargo, y pueden usarse más generalmente en una población. Para cepas pandémicas, se prefiere la administración de todos los grupos de edad.

Las composiciones preferidas satisfacen 1, 2 ó 3 de los criterios CPMP para la eficacia. En adultos (18-60 años), estos criterios son: (1)  $\geq 70$  % de seroprotección; (2)  $\geq 40$  % de seroconversión; y/o (3) un aumento GMT de  $\geq 2,5$  veces. En los ancianos (>60 años), estos criterios son: (1)  $\geq 60$  % de seroprotección; (2)  $\geq 30$  % de seroconversión; y/o (3) un aumento GMT de  $\geq 2$  veces. Estos criterios se basan en estudios de etiqueta abierta con al menos 50 pacientes.

El tratamiento puede ser por un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden darse por la misma o diferentes vías, por ejemplo, un sensibilización parenteral y refuerzo a la mucosa, una sensibilización a la mucosa y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (normalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente vírgenes, por ejemplo, para gente que nunca ha recibido una vacuna de la influenza anteriormente, o para vacuna contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico). Las múltiples dosis normalmente se administrarán al menos separadas 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Las vacunas producidas por la invención pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un procesional sanitario o centro de vacunación) otras vacunas, por ejemplo, en sustancialmente el mismo momento que una vacuna del sarampión, una vacuna de las paperas, una vacuna de la rubéola, una vacuna MMR, una vacuna de la varicela, una vacuna MMRV, una vacuna de la difteria, una vacuna del tétanos, una vacuna de pertussis, una vacuna DTP, una vacuna conjugada de *H. influenzae* tipo b, una vacuna inactivada de poliovirus, una vacuna del virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada de meningococos (tal como una vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna del virus sincitial respiratorio, una vacuna conjugada de neumococos, etc. La administración en sustancialmente el mismo momento que una vacuna de neumococos y/o una vacuna de meningococos es particularmente útil en paciente ancianos.

Asimismo, las vacunas pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un procesional sanitario) un compuesto antiviral, y en particular un compuesto antiviral activo contra el virus de la influenza (por ejemplo, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de neuraminidasa, tal como un ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo ésteres de los mismos (por ejemplo, los ésteres etílicos) y sales de los mismos (por ejemplo, las sales fosfato). Un antiviral preferido es éster etílico del ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, fosfato (1:1), también conocido como oseltamivir fosfato (TAMIFLU™).

### **General**

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede constar exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo,  $x \pm 10$  %.

Salvo que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces pueden combinarse dos componentes entre sí, y después la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE), y en particular libres de encefalopatía espongiiforme bovina (BSE). Globalmente, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede remplazarse, como alternativa, por un profármaco adecuado.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra la construcción de expresión que se usó para ensayar la actividad del promotor de pol I con un informador de luciferasa.

La Figura 2 muestra la secuencia del promotor humano de pol I humana de longitud completa (FL) (SEC ID N° 1). La secuencia del promotor humano de Pol I pHW2000 (SEC ID N° 2; promotor "corto" de pol I humana) dentro de la secuencia de longitud completa se muestra en fuente subrayada. La fecha indica el sitio de inicio de la transcripción.



La Figura 3 muestra la secuencia del promotor canino de pol I de longitud completa (FL) (NW\_878945; SEC ID N° 3). La secuencia CORTA del promotor en la secuencia de longitud completa del promotor se muestra en letras mayúsculas subrayadas (SEC ID N° 5); la secuencia MID del promotor dentro de la secuencia de longitud completa se muestra en letras mayúsculas subrayadas y letras minúsculas en negrita (SEC ID N° 4).

5 La Figura 4 muestra la actividad del promotor canino de pol I en células MDCK. Las columnas grises muestran los resultados con el promotor canino de pol I FL, las columnas con bandeo muestran los resultados con el promotor canino MID y las columnas punteadas muestran los resultados con el promotor CORTO canino de pol I. "A" indica LUC y polimerasa viral, "B" indica LUC e infección (MOI = 0,05), "C" indica LUC y "D" es sin ADN. El eje y indica unidades de luz relativas (RLU).

10 La Figura 5 muestra la actividad del promotor humano de pol I en células MDCK 33016. Las columnas grises muestran los resultados con el promotor humano de pol I, las columnas con bandeo muestran los resultados con el promotor canino de pol I FL, las columnas punteadas muestran los resultados con el promotor canino MID de pol I y las columnas bandeadas verticalmente muestran los resultados con el promotor CORTO canino de pol I. "A" indica LUC y polimerasa viral, "B" indica LUC e infección (MOI = 0,05) y "C" indica LUC. El eje y indica unidades de luz relativas (RLU).

15 La Figura 6 muestra una comparación de la actividad del promotor FL y CORTO de pol I humana y el promotor canino de pol I de longitud completa en células MDCK 33016. Las columnas grises muestran los resultados con el promotor humano de longitud completa, las columnas con bandeo muestran los resultados con el promotor canino de longitud completa y las columnas punteadas muestran los resultados con el promotor corto de pol I humana. A indica LUC+polimerasa, B indica LUC+infección y C muestra LUC solamente. El eje y indica unidades de luz relativas (RLU).

20 La Figura 7 muestra la actividad del promotor humano de pol I (columnas punteadas) y el promotor canino de pol I (columnas con bandeo) en células MDCK 33016 (Figura 7A) y en células MDCK ATCC (Figura 7B). A indica LUC+polimerasa, B indica LUC+infección y C muestra LUC solamente. El eje y indica unidades de luz relativas (RLU).

La Figura 8 muestra un análisis de transferencia de western de las proteínas M y NP en lisados celulares después del rescate del virus.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de formación de focos usando sobrenadante de células infectadas con construcciones de genética inversa.

30 La Figura 10 muestra una alineación de secuencias de ADN de promotores humano y canino de pol I (SEC ID N° 1 y 3, respectivamente).

35 La Figura 11A muestra los niveles de expresión de un transgén informador bajo el control del promotor humano de pol I (hPol I) o el promotor canino de pol I (cPol I) en células MDCK ATCC, MDCK 33016-PF y 293T. Las columnas vacías representan los resultados con células 293T, las columnas blancas muestran los resultados con células MDCK 33016-PF y las columnas con bandeo representan los resultados con células MDCK ATCC.

La Figura 11B compara la eficacia de transfección en células humanas y caninas. El eje y en ambos gráficos indica unidades de luz relativas (RLU).

40 La Figura 12 muestra el rescate de la cepa de influenza A/Puerto Rico/8/34 por genética inversa basada en el promotor humano de pol I en células MDCK ATCC, MDCK 33016-PF y 293T en presencia (columnas blancas) y ausencia (columnas negras) del plásmido auxiliar TMPRSS2 y con (columnas negras) y sin (columnas blancas) adición de células de alimentación (12B). El eje y representa el título de virus (ffu/ml).

45 La Figura 13 compara el rescate de la cepa de influenza A/Puerto Rico/8/34 por genética inversa dirigida por pol I humana o canina en células MDCK 33016-PF. Las columnas negras muestran los resultados en ausencia del plásmido auxiliar TMPRSS2 y las barras blancas muestran el resultado en presencia del plásmido auxiliar TMPRSS2. El eje y representa el título de virus (ffu/ml).

**Breve descripción de la lista de secuencias**

La SEC ID N° 1 es la secuencia de longitud completa (FL) del promotor humano de pol I

La SEC ID N° 2 es la secuencia pHW2000 del promotor humano de Pol I

La SEC ID N° 3 es la secuencia de longitud completa (FL) del promotor canino de pol I

50 La SEC ID N° 4 es la secuencia MID del promotor canino de pol I

La SEC ID N° 5 es la secuencia CORTA del promotor canino de pol I

La SEC ID Nº 6 es la secuencia de HA de A/California/04/09

La SEC ID Nº 7 es la secuencia de HA de A/Chile/1/1983

La SEC ID Nº 8 es la secuencia de NA de A/California/04/09

La SEC ID Nº 9 es la secuencia de NA de A/Chile/1/1983

5 **Modos de realizar la invención**

***El promotor humano de pol I es activo en células humanas así como en células caninas.***

10 Para evaluar la actividad del promotor de pol I en células huésped no endógenas, se transfectaron células MDCK con una construcción de expresión que permite la expresión de un ARN de luciferasa (luc) en dirección antisentido bajo el control de un fragmento de 487 pb del promotor humano de pol I o diversos fragmentos del promotor canino de pol I (como se muestra en la Figura 3). El ARN expresado puede transcribirse en ARNm por una polimerasa viral y posteriormente puede traducirse en la proteína luc. Por tanto, las células que expresan el transgén pueden identificarse fácilmente ensayando la actividad luciferasa. Para que el ensayo funcione es necesario proporcionar polimerasa viral. Esto puede conseguirse por co-transfección de la célula con construcciones de expresión que codifican la polimerasa viral o, como alternativa, por infección de la célula transfectada con un virus auxiliar. El ensayo se ilustra en la Figura 1.

15 La Figura 11A muestra que el promotor humano de pol I es capaz de dirigir la expresión del transgén en células MDCK ATCC y también en células MDCK 33016-PF con la misma eficacia que el promotor canino de pol I. Los niveles de expresión del transgén con el promotor humano de pol I en células MDCK ATCC son incluso mayores que los observados en células humanas 293T. Para confirmar que la eficacia de transfección de los tipos celulares ensayados son comparables, se transfectaron con una construcción que contenía un gen luciferasa bajo el control de un promotor CMV. Se midió el nivel de actividad luciferasa. Los resultados se muestran en la Figura 11B y confirman que la eficacia de transfección de las células ensayadas es comparable.

20 La Figura 4 muestra que todos los fragmentos ensayados del promotor canino de pol I pueden dirigir la expresión del transgén luc en células MDCK. Además, la Figura 5 demuestra que el promotor humano de pol I de longitud completa es capaz de dirigir la expresión del transgén en células MDCK y es incluso más eficaz que el promotor canino de pol I.

25 Para definir adicionalmente la región del promotor humano de pol I que es necesaria para dirigir la expresión del transgén, el experimento se repitió con un fragmento del promotor humano de pol I como se muestra en la Figura 2 (pol I "corta"). Se descubrió que, aunque el promotor de pol I de longitud completa es más activo, tanto el promotor humano de pol I de longitud completa como el corto son activos en células MDCK (Figura 6).

30 Las construcciones que contienen las secuencias humana y canina del promotor de pol I se introdujeron adicionalmente por transfección en células MDCK de la ATCC y MDCK 33016 [18] para determinar si la actividad del promotor humano de pol I está restringida a una cierta línea celular. Como se muestra en la Figura 7, el promotor humano de pol I fue capaz de dirigir la expresión del transgén en ambos tipos celulares pero la expresión fue más eficaz en células MDCK 33016.

Rescate del virus de la influenza de células MDCK usando el promotor humano de pol I.

35 La eficacia del rescate del virus de la influenza usando el promotor humano de pol I se comparó en células MDCK y 293T. El genoma viral de influenza se clonó en vectores de expresión pHW2000 [69]. Este vector contiene un fragmento del promotor humano de pol I que demostró ser activo en células MDCK (véase la Figura 5). En particular, se usaron los siguientes vectores: pHW-WSN PA (0,534 µg/µl); pHW-WSN PB1 (0,432 µg/µl); pHW-WSN PB2 (0,357 µg/µl); pHW-WSN NP (0,284 µg/µl); pHW-WSN NS (0,217 µg/µl); pHW-WSN M (0,232 µg/µl); pHW-WSN HA (0,169 µg/µl); pHW-WSN NA (0,280 µg/µl) y pcDNA-TMPRSS (0,775 µg/µl; que codifica serín proteasa). Los genes que codifican proteína se controlaron por un promotor de citomegalovirus (CMV).

40 Para el rescate de virus, se sembraron células 293T a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con FCS al 10 %. Se sembraron células MDCK a  $0,3 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio. Las células se incubaron durante una noche a 37 °C y se transfectaron cuando hubieron alcanzado una confluencia del 50-80 %.

45 Se transfectaron células 293T y MDCK usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche Cat. Nº 11988387001) y reactivo Lipofectamina LTX Plus (Invitrogen Cat. Nº 15338-100), respectivamente. Las células se transfectaron con 1 µg de cada vector de acuerdo con los siguientes protocolos. Para FuGENE 6, el reactivo (3 µl de FuGENE/µg de ADN) se diluyó en 73 µl de medio sin suero (sin antibióticos), se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de ello, se añadió el ADN a cada Eugene diluido, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos. El complejo ADN/FuGENE se añadió gota a gota a las células 293T sin retirar el medio de cultivo y las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

5 Para la transfección con lipofectamina, el reactivo (25 µl) se diluyó en 500 µl de medio sin suero y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió el ADN y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadieron gota a gota 500 µl de medio sin suero al reactivo de transfección después de haber retirado el medio de cultivo de las células. Las células se incubaron posteriormente a 37 °C durante 24 horas. Después de 24 horas desde la transfección, se cambió el medio.

Dos días después de la infección, se recogió el sobrenadante de las células por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. El virus recogido en el sobrenadante se usó para ensayos de formación de focos. Además, las células infectadas se lisaron y usaron para análisis de transferencia de Western.

*Análisis de transferencia de Western*

10 Las células 293T y MDCK se lisaron y sometieron a análisis de transferencia de Western de acuerdo con protocolos convencionales. Se usaron anticuerpos contra la proteína M y NP para detectar estas proteínas sobre la membrana. Se usaron anticuerpos contra S6 como control de carga. Los carriles marcados como 'WSN' se cargaron con proteínas del virus rescatado. Los carriles marcados 'M' y 'NP' contienen proteínas M y NP recombinantes como control. Como estas proteínas recombinantes se expresaron a partir de un gen diferente, migran ligeramente más despacio en el gel.

Los resultados del análisis se muestran en la Figura 8 donde es evidente que la construcción de expresión bajo el control del promotor humano de pol I permite el rescate viral en células 293T así como en células MDCK.

*Ensayos de formación de focos*

20 Se sembraron células MDCK sin infectar a una densidad de  $6,25 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 48 pocillos en 500 µl de DMEM con FCS al 10 %. El siguiente día, las células se infectaron con virus en un volumen de 100-150 µl durante 2 horas a 37 °C. Las células se infectaron de este modo con diversas diluciones del virus. Dos horas después de la infección, se aspiró el medio y se añadieron 500 µl de DMEM con FCS al 10 % a cada pocillo. Las células se incubaron a 37 °C hasta el siguiente día.

25 Después de 24 horas tras la infección, se aspiró el medio y se lavaron las células una vez con PBS. Se añadieron 500 µl de acetona al 80 % enfriada en hielo en PBS a cada pocillo seguido de incubación a 4 °C durante 30 minutos. La mezcla de acetona se aspiró y se lavaron las células una vez con PBST (PBS + Tween al 0,1 %). Se añadieron 500 µl de BSA al 2 % en PBS a cada pocillo seguido de incubación a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Se añadieron 500 µl de una dilución 1:6000 de anti-NP en tampón de bloqueo seguido de incubación a TA durante 2 horas. Se aspiró la solución de anticuerpo y las células se lavaron dos veces con PBST. Se añadió anticuerpo secundario (de cabra anti ratón) a una dilución 1:2000 en 500 µl de tampón de bloqueo y la placa se incubó a TA durante 2 horas. Se aspiró la solución de anticuerpo y las células se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 500 µl de azul verdadero KPL a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos. La reacción se detuvo por aspiración del azul verdadero y lavando una vez con dH<sub>2</sub>O. Se aspiró el agua y se dejó que secan las células.

35 Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 9 que demuestra claramente que se obtuvo virus infeccioso de células 293T así como células MDCK.

40 También se ensayó el rescate de virus de la cepa de influenza A/Puerto Rico/8/34 usando un sistema de genética inversa de pol I humana en células MDCK ATCC, MDCK 33016-PF y 293T como se describe en la referencia 70. Los experimentos se realizaron en los virus que se habían rescatado en presencia y ausencia del plásmido auxiliar TMRSS2 que codifica una serín proteasa. Además, el rescate viral se realizó con y sin la adición de células de alimentación 24 horas después del rescate viral. Los resultados se muestran en la Figura 12 y demuestra que podía conseguirse un rescate viral eficaz en células MDCK en diversas condiciones usando el promotor humano de pol I.

45 Para comparar si la eficacia del rescate viral en MDCK 33016-PF usando un promotor humano de pol I es comparable con el rescate usando un promotor canino de pol I, las células se transfectaron con un sistema RG de pol I humana o un sistema RG de pol I canina como se describe en la referencia 70. Los experimentos se realizaron en presencia y ausencia del plásmido auxiliar TMRSS. Los resultados (Figura 13) demuestran que la cepa A/Puerto Rico/8/34 se rescató con eficacia comparable al sistema de pol I canina cuando se usó el sistema de pol I humana.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden hacerse modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención.

50 **Referencias**

[1] Documento WO2007/002008  
 [2] Documento WO2007/124327  
 [3] Koudstaal y col. (2009) Vaccine 272588-2593  
 [4] Documento WO2009/000891

- [5] Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., 1989, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [6] Racaniello y Baltimore (1981) *Science* 214:916-919
- [7] Kaplan y col. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8424-8428
- 5 [8] Fodor y col. (1999) *J. Virol* 73(11):9679-9682
- [9] Hoffmann y col. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11411-11416
- [10] Kobayashi y col. (2007) *Cell Host Microbe* 19;1(2):147-57
- [11] Stech y col. (2008) *Nucleic Acids Res* 36(21):e139
- [12] Kistner y col. (1998) *Vaccine* 16:960-8
- 10 [13] Kistner y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110
- [14] Bruhl y col. (2000) *Vaccine* 19:1149-58
- [15] Pau y col. (2001) *Vaccine* 19:2716-21
- [16] <http://www.atcc.org/>
- [17] <http://locus.umdj.edu/>
- 15 [18] Documento WO97/37000
- [19] Brands y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100
- [20] Halperin y col. (2002) *Vaccine* 20:1240-7
- [21] Documento EP-A-1260581 (documento WO01/64846)
- [22] Documento W02006/071563
- 20 [23] Documento WO2005/113758
- [24] Documento WO97/37001
- [25] Neumann y col. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16825-9
- [26] Documento WO02/28422
- [27] Documento WO02/067983
- 25 [28] Documento WO02/074336
- [29] Documento WO01/21151
- [30] Documento WO02/097072
- [31] Documento WO2005/113756
- [32] *Vaccines*. (eds. Plotkins & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0
- 30 [33] Huckriede y col. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91
- [34] Treanor y col. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70
- [35] Keitel y col. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10
- [36] Herlocher y col. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30
- [37] Le y col. (2005) *Nature* 437(7062):1108
- 35 [38] Documento WO2008/068631
- [39] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472
- [40] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96
- [41] Nony y col. (2001) *Vaccine* 27:3645-51
- [42] Documento EP-B-0870508
- 40 [43] Documento US 5948410
- [44] Documento WO2007/052163
- [45] Documento W02007/052061
- [46] Documento WO90/14837
- [47] Podda y Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203
- 45 [48] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680
- [49] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)
- [50] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan
- 50 [51] Documento WO2008/043774
- [52] Allison y Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25
- [53] Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9
- [54] Documento US-2007/014805
- [55] Documento US-2007/0191314
- 55 [56] Suli y col. (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9
- [57] Documento WO95/11700
- [58] Patente de Estados Unidos 6.080.725
- [59] Documento WO2005/097181
- [60] Documento WO2006/113373
- 60 [61] Potter y Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75
- [62] Greenbaum y col. (2004) *Vaccine* 22:2566-77
- [63] Zurbriggen y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304
- [64] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30
- [65] Mann y col. (2004) *Vaccine* 22:2425-9
- 65 [66] Halperin y col. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50
- [67] Herbert y col. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8

[68] Chen y col. (2003) Vaccine 21:2830-6  
 [69] Hoffmann y col. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:6108  
 [70] Suphaphiphat y col. (2010) J. Virol. 84(7) 3721-3725  
 [71] Murakami y col. (2008) J. Virol. 82(3):1605-9

5 **Lista de secuencias**

- <110> NOVARTIS AG  
 DORMITZER Philip  
 FRANTI Michael
- 10 SUPHAPHIPHAT Pirada  
 MASON Peter  
 KEINER Bjoern  
 CROTTA Stephania
- 15 <120> GENÉTICA INVERSA USANDO PROMOTORES NO ENDÓGENOS DE POL I
- <130> P054792WO
- <140> PCT/IB2010/  
 20 <141> 21-05-2010
- <150> US61/216.919  
 <151> 21-05-2009
- 25 <160> 9
- <170> Seqwin99, versión 1.02
- <210> 1  
 30 <211> 499  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 35
- |            |            |            |             |            |            |     |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| tttccgagtc | cccgtgggga | gccggggacc | gtcccgcgcc  | cgcccccccg | gtgccgggga | 60  |
| gcggtccccg | ggccggggcg | cggtcccctc | gccgcgatcc  | tttctggcga | gtccccgtgc | 120 |
| ggagtcggag | agcgcctccc | gagcgcgcgt | gcggccccgag | aggtcgcgcc | tggccggcct | 180 |
| tcggtcccct | gtgtgtcccg | gtcgtaggag | gggcccggccg | aaaatgcttc | cggtccccgc | 240 |
| tctggagaca | cgggccggcc | ccctgcgtgt | ggcacgggcg  | gccgggaggg | cgccccggc  | 300 |
| ccggcgtgc  | tcccgcgtgt | gtcctggggt | tgaccagagg  | gccccgggcg | ctccgtgtgt | 360 |
| ggctgcgatg | gtggcgtttt | tggggacagg | tgtccgtgtc  | gcgcgtcgcc | tgggcccggc | 420 |
| gcgtggtcgg | tgacgcgacc | tccccggccc | gggggaggta  | tatctttcgc | tccgagtcgg | 480 |
| cattttgggc | cgccccgggt |            |             |            |            | 499 |
- <210> 2  
 40 <211> 219  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens
- <400> 2
- |            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gccgggaggg | cgccccggc  | ccggcgtgc  | tcccgcgtgt | gtcctggggt | tgaccagagg | 60  |
| gccccgggcg | ctccgtgtgt | ggctgcgatg | gtggcgtttt | tggggacagg | tgtccgtgtc | 120 |
| gcgcgtcgcc | tgggcccggc | gcgtggtcgg | tgacgcgacc | tccccggccc | gggggaggta | 180 |
| tatctttcgc | tccgagtcgg | cattttgggc | cgccccgggt |            |            | 219 |
- 45
- <210> 3  
 <211> 1814  
 <212> ADN  
 50 <213> Homo sapiens
- <220>  
 <221> misc\_feature

<222> 1647  
 <223> N = A, C, T o G

<400> 3

agcgtgagca	ggagaattct	ggagaaacag	attgtgttat	aagaaagaaa	gaaagaaaga	60
aagaaagaaa	gaaagagaaa	atccttatgt	tctttgagcc	tccccctccc	cccagaattg	120
agttcctctt	ccacgacctc	ttctcattca	acccaataga	caagtatttg	gggggggggg	180
gtcaggtccc	agacgcttaa	agggtggaag	tgaaagtgg	gcgggggaag	ggggggggca	240
caccgtcctc	tccagcgctt	ttggttcaaa	cctccttcgt	gacctcctc	cctcccctcc	300
tccttcgtct	tataaatata	taaataaaat	cctaaagaaa	aagaaaaaaa	aaaaaaaaaa	360

aaaggaagga	cacgagaaaa	aacggtgcat	ccgttgccgt	cctaagagtc	ctcgcctggt	420
ttcggctcta	cgttccctcc	ctgacctcgg	aaacgtgcct	gagtcgtccc	gggagccccg	480
cgcggcgagc	gcgaccccc	ttccgggcgg	cagcgggccc	ggacggacgg	acggacggac	540
ggacggggtt	tccaaggctc	ccccgccccg	ggaggacggg	ggttcgcgcg	gtgcgcggcc	600
gtgtgtctcc	ggggccctcc	gccgtccccg	ggccgagagg	cgagatccga	ggcgcctga	660
cggcctcgcc	gcccggatct	gtcccgtgtg	cgttcgcgcc	ggttgtcggg	tgccacctgg	720
cggccgcttt	tatagagcgt	gtcccctcgg	gaggctcggc	ggcgacaggc	aaggaacagc	780
tttgggtgctg	gtttcccggg	gccgagtccc	aggaggaggg	cggctccggc	gcgagcgtcc	840
ggctgtcgcc	ggggcctcgg	cgcgcgatgc	gctcgcggga	gattggacct	ccggagctgc	900
gagggagtgt	cgccgtcgcc	gctgtcgccg	ctgtcgcctc	cgctcgcctc	ccggaggagg	960
cgctgcgggc	cgcctgggtg	ggtcgaccag	caccgcggcg	tggctcctcc	tccgcccggc	1020
cggaccgacc	tgggcccgcct	cgggggcggg	ggacagggtg	tgtcccggcg	tccgtcctgt	1080
ggctccgggc	gatcttcggg	ccttcctccc	gtgtcactcg	gttgtctccc	gtggtcacgc	1140
cctggcgacg	gggaccggtc	tgagcctgga	ggggaagccc	gtgggtggcg	cgacagacct	1200
ggctgcgggc	acgtgtgggg	gtcccggggc	tcggacgcga	tttctcctcc	ttgttccgag	1260
gcccgtgctg	gaggtgggtc	ccgggcgggtc	ggaccgggtg	ccacgcgggg	gtgggcgggc	1320
cgctccgttcg	ggcgtccggc	cccgggtggc	attcccgggtg	aggctgcctc	tgccgcgcgt	1380
ggcctccac	ctcccctggc	ccgagccggg	gttggggacg	gcggtaggca	cggggcggtc	1440
ctgagggccg	cgggggacgg	cctccgcacg	gtgcctgcct	ccggagaact	ttgatgattt	1500
ttcaaagtct	cctcccggag	atactggcg	tggcggcgtg	gcggcgtggc	ggcgtggcgg	1560
cgtggcgtct	ccaccgaccg	cgtatcgccc	ctcctcacc	cccccccccc	ccgggttacc	1620
tggggcgacc	agaaagccct	gggggcnggg	ggctccgtgg	gggtgggggtg	ggggggcgcc	1680
gtggggcgcc	ttttgggtac	agttggcctg	gtcacgggtc	cgggaggtcg	cggtgacctg	1740
tggctggctc	ccgcccggcag	gcgcggttat	tttcttggcc	gaaatgaaca	ttttttgttg	1800
ccaggtaggt	gctg					1814

5

<210> 4  
 <211> 474  
 <212> ADN  
 <213> Canis spec.

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 307  
 <223> N = A, T, C o G

15

<400> 4

cccgggtggc	attcccgggtg	aggetgcctc	tgccgcgcgt	ggccctccac	ctcccctggc	60
ccgagccggg	gttggggacg	gcggtaggca	cggggcggtc	ctgagggccg	cgggggacgg	120
cctccgcacg	gtgcctgcct	ccggagaact	ttgatgattt	ttcaaagtct	cctcccggag	180
atactggcg	tggcggcgtg	gcggcgtggc	ggcgtggcgg	cgtggcgtct	ccaccgaccg	240
cgtatcgccc	ctcctcacc	cccccccccc	ccgggttacc	tggggcgacc	agaaagccct	300
gggggcnggg	ggctccgtgg	ggtgggggtg	ggggggcgcc	gtggggcagg	ttttgggtac	360
agttggccgt	gtcacggctc	cgggaggtcg	cggtgacctg	tggctggctc	ccgcccggcag	420
gcgcgggttat	tttcttggcc	gaaatgaaca	ttttttgttg	ccaggtaggt	gctg	474

20

<210> 5  
 <211> 288  
 <212> ADN  
 <213> Canis spec.

25

<220>

ES 2 394 797 T3

<221> misc\_feature,  
<222> 121  
<223> N = A, C, T o G

5 <400> 5

```
ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg accgcgtatc 60
gccccctctc accccccccc ccccccggtt tacctggggc gaccagaaag ccctgggggc 120
ngggggctcc gtgggggtggg ggtggggggg cgccgtgggg caggttttgg gtacagttgg 180
ccgtgtcacg gtcccgggag gtcgcggtga cctgtggctg gtcccgcggc gcaggcgcgg 240
ttatcttctt gcccgaaatg aacatttttt gttgccaggt aggtgctg 288
```

10 <210> 6  
<211> 566  
<212> PRT  
<213> Virus de la influenza A

15 <400> 6

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr  
 20 25 30  
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn  
 35 40 45  
 Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val  
 50 55 60  
 Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile  
 85 90 95  
 Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe  
 100 105 110  
 Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe  
 115 120 125  
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp  
 130 135 140  
 Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro  
 165 170 175  
 Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val  
 180 185 190  
 Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu  
 195 200 205  
 Tyr Gln Asn Ala Asp Thr Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser  
 210 215 220  
 Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln  
 225 230 235 240  
 Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys  
 245 250 255  
 Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe  
 260 265 270  
 Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro  
 275 280 285  
 Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn  
 290 295 300  
 Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg  
 325 330 335  
 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
 340 345 350  
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr



	355					360					365				
His	His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser
	370					375					380				
Thr	Gln	Asn	Ala	Ile	Asp	Glu	Ile	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile
385					390					395					400
Glu	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn	His
				405					410					415	
Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Val	Asp	Asp	Gly	Phe
			420					425					430		
Leu	Asp	Ile	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Asn
		435					440					445			
Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Tyr	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Glu
	450					455					460				
Lys	Val	Arg	Ser	Gln	Leu	Lys	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Asn	Gly
465					470					475					480
Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Thr	Cys	Met	Glu	Ser	Val
				485					490					495	
Lys	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala	Lys	Leu
			500					505					510		
Asn	Arg	Glu	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Thr	Arg	Ile	Tyr
		515					520					525			
Gln	Ile	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Val
	530					535					540				
Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Ser	Phe	Trp	Met	Cys	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu
545					550					555					560
Gln	Cys	Arg	Ile	Cys	Ile										
				565											

<210> 7

<211> 566

5 <212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 7

ES 2 394 797 T3

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ser Ala Thr Asp  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr  
 20 25 30  
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn  
 35 40 45  
 Leu Leu Glu Asp Asn His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile  
 50 55 60  
 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile  
 85 90 95  
 Ala Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe  
 100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe  
 115 120 125  
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Lys His Asn  
 130 135 140  
 Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Lys Gly Lys Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro  
 165 170 175  
 Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val  
 180 185 190  
 Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Glu Asp Gln Lys Thr Ile  
 195 200 205  
 Tyr Arg Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Asn  
 210 215 220  
 Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln  
 225 230 235 240  
 Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr  
 245 250 255  
 Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe  
 260 265 270  
 Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser  
 275 280 285  
 Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn  
 290 295 300  
 Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg  
 325 330 335  
 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
 340 345 350  
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr  
 355 360 365  
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser  
 370 375 380  
 Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile  
 385 390 395 400  
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys  
 405 410 415  
 Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe  
 420 425 430  
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn  
 435 440 445  
 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu  
 450 455 460  
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly  
 465 470 475 480

ES 2 394 797 T3

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val  
485 490 495  
Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu  
500 505  
Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr  
515 520 525  
Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu  
530 535 540  
Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu  
545 550 555 560  
Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
565

<210> 8

<211> 469

<212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 8

5

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Cys Met Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Met Ala Asn Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile  
 20 25 30  
 Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Leu Gly Asn Gln Asn Gln Ile Glu Thr  
 35 40 45  
 Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln  
 50 55 60  
 Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val  
 65 70 75 80  
 Val Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly  
 85 90 95  
 Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly  
 100 105 110  
 Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser Pro Leu Glu  
 115 120 125  
 Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His  
 130 135 140  
 Ser Asn Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Ile Gly Glu Val Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser  
 165 170 175  
 Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Asn Trp Leu Thr  
 180 185 190  
 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr  
 195 200 205  
 Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu  
 210 215 220  
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr

```

225                230                235                240
val Met Thr Asp Gly245 Pro Ser Asn Gly Gln250 Ala Ser Tyr Lys Ile255 Phe
Arg Ile Glu Lys260 Gly Lys Ile Val Lys265 Ser val Glu Met Asn270 Ala Pro
Asn Tyr His275 Tyr Glu Glu Cys Ser280 Cys Tyr Pro Asp Ser285 Ser Glu Ile
Thr Cys290 Val Cys Arg Asp Asn295 Trp His Gly Ser Asn300 Arg Pro Trp Val
Ser305 Phe Asn Gln Asn Leu310 Glu Tyr Gln Ile Gly315 Tyr Ile Cys Ser Gly320
Ile Phe Gly Asp Asn325 Pro Arg Pro Asn Asp330 Lys Thr Gly Ser Cys335 Gly
Pro Val Ser Ser340 Asn Gly Ala Asn Gly345 Val Lys Gly Phe Ser350 Phe Lys
Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly360 Arg Thr Lys Ser Ile365 Ser Ser Arg
Asn Gly370 Phe Glu Met Ile Trp375 Asp Pro Asn Gly Trp380 Thr Gly Thr Asp
Asn Asn Phe Ser Ile Lys390 Gln Asp Ile Val Gly395 Ile Asn Glu Trp Ser400
Gly Tyr Ser Gly Ser405 Phe Val Gln His Pro410 Glu Leu Thr Gly Leu Asp415
Cys Ile Arg Pro420 Cys Phe Trp Val Glu425 Leu Ile Arg Gly Arg430 Pro Lys
Glu Asn Thr435 Ile Trp Thr Ser Gly440 Ser Ser Ile Ser Phe445 Cys Gly Val
Asn Ser450 Asp Thr Val Gly Trp455 Ser Trp Pro Asp Gly460 Ala Glu Leu Pro
Phe Thr Ile Asp Lys
465

```

- <210> 9
- <211> 470
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la influenza A
- <400> 9

ES 2 394 797 T3

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys Met Thr  
1 5 10 15  
Ile Gly Ile Ile Ser Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile  
20 25 30  
Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Ser Gln Asn His Thr Gly Ile  
35 40 45  
Cys Asn Gln Arg Ile Ile Thr Tyr Glu Asn Ser Thr Trp Val Asn Gln  
50 55 60  
Thr Tyr Val Asn Ile Asn Asn Thr Asn Val Val Ala Gly Lys Asp Thr  
65 70 75 80

Thr Ser Val Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Arg Gly  
 85 90 95  
 Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly  
 100 105 110  
 Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu  
 115 120 125  
 Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His  
 130 135 140  
 Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Ala Leu Met Ser  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Ile Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser  
 165 170 175  
 Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Met Gly Trp Leu Thr  
 180 185 190  
 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asp Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr  
 195 200 205  
 Asn Gly Ile Ile Thr Glu Thr Ile Lys Ser Trp Arg Lys Arg Ile Leu  
 210 215 220  
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr  
 225 230 235 240  
 Ile Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Pro Ala Ser Tyr Arg Ile Phe  
 245 250 255  
 Lys Ile Glu Lys Gly Lys Ile Thr Lys Ser Ile Glu Leu Asp Ala Pro  
 260 265 270  
 Asn Ser His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Thr Gly Thr Val  
 275 280 285  
 Met Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val  
 290 295 300  
 Ser Phe Asn Gln Asn Leu Asp Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Lys Asp Gly Lys Gly Ser Cys Asp  
 325 330 335  
 Pro Val Thr Val Asp Gly Ala Asp Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Arg  
 340 345 350  
 Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Asn Ser Ser Arg  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Asp Thr Asp  
 370 375 380  
 Ser Asn Phe Leu Val Lys Gln Asp Val Val Ala Met Thr Asp Trp Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp  
 405 410 415  
 Cys Met Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Val Arg Gly Arg Pro Arg  
 420 425 430  
 Glu Gly Thr Thr Val Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly  
 435 440 445



ES 2 394 797 T3

Val Asn Ser Asp Thr Ala Asn Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu  
450 455 460  
Pro Phe Thr Ile Asp Lys  
465 470

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un procedimiento para producir un virus recombinante, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped canina que comprende al menos una construcción de expresión que codifica una molécula de ARN viral, en el que la expresión de la molécula de ARN viral a partir de la construcción está controlada por un promotor de primate de pol I en condiciones en las que se expresa la molécula de ARN viral para producir virus.
- 2.- Un procedimiento para preparar un virus, que comprende las etapas de: (i) producir un virus recombinante por el procedimiento de la reivindicación 1; (ii) infectar un huésped de cultivo con el virus obtenido en la etapa (i); (iii) cultivar el huésped de la etapa (ii) para producir virus adicionales; y (iv) purificar el virus obtenido en la etapa (iii).
- 10 3.- Un procedimiento para preparar una vacuna, que comprende las etapas de (a) preparar virus por el procedimiento de la reivindicación 2 y (b) preparar vacuna a partir del virus.
- 4.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que el promotor de pol I es un promotor humano de pol I.
- 5.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que la célula es una célula MDCK.
- 15 6.- El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la célula MDCK es la línea celular MDCK 33016 (DSM ACC2219).
- 7.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la célula incluye al menos una construcción de expresión bidireccional.
- 8.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la construcción de expresión es un vector de expresión o una construcción de expresión lineal.
- 20 9.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el promotor humano de pol I comprende la secuencia de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.
- 10.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el virus es un virus segmentado.
- 11.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el virus es un virus no segmentado.
- 12.- El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el virus es un virus ARN de cadena negativa.
- 25 13.- El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el virus es virus de la influenza.
- 14.- Una célula huésped canina que produce un virus, que comprende al menos una construcción de expresión que codifica una molécula de ARN viral, en la que la expresión de la molécula de ARN viral a partir de la construcción está controlada por un promotor de primate de pol I.
- 30 15.- Una célula canina que produce un virus, que tiene al menos un promotor endógeno de pol I que controla la expresión del ARNr endógeno y al menos un promotor no endógeno de primate de pol I que controla la expresión de un ARN viral o el complemento del mismo.

Figura 1

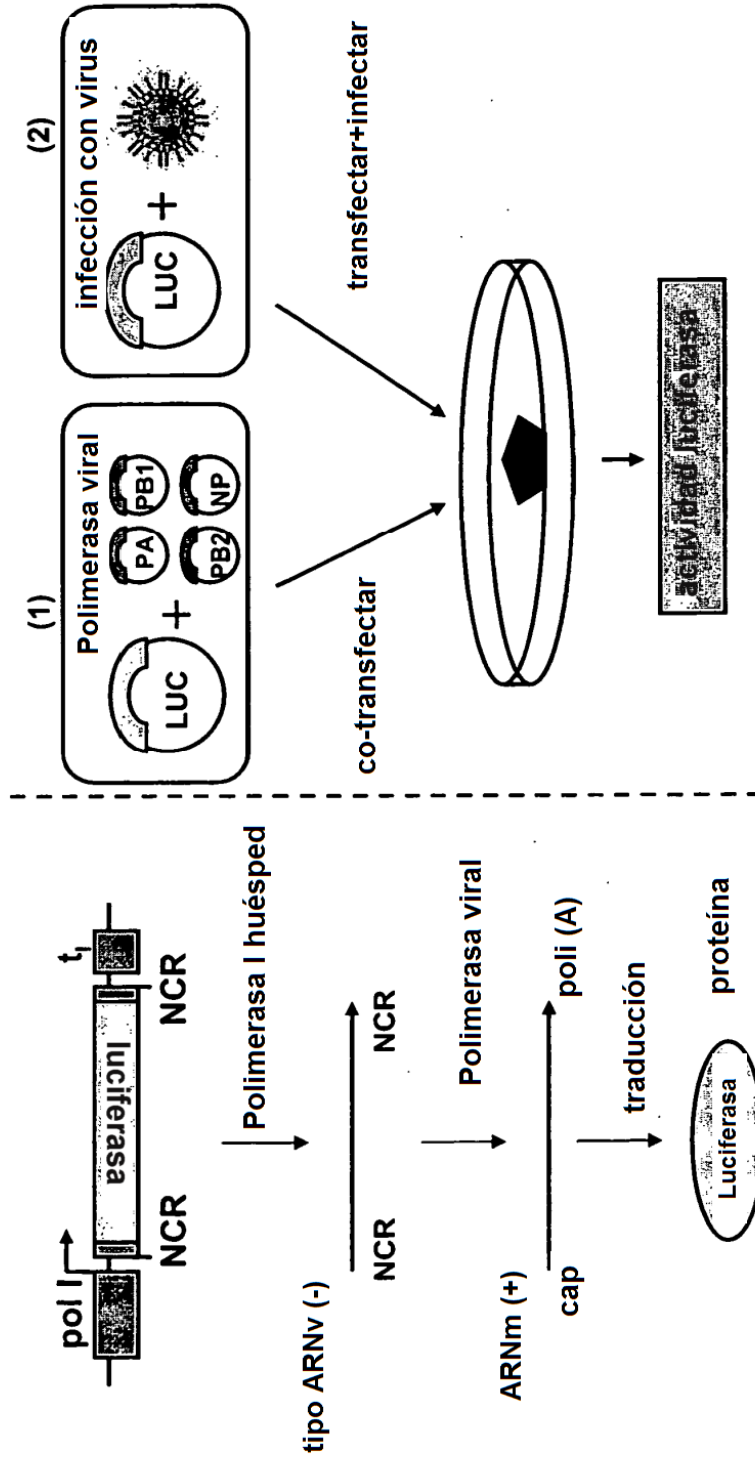


Figura 2


TTTCCGAGTCCCCTGGGAGCCGGGACCGTCCCGCCCGTCCCGGGGT  
GCCGGGAGCGGTCCCCTGGGCGCGGGTCCCTCTGCCCGGATCCTTTCT  
GGCAGTCCCCTGGGAGTCCGAGAGCGCTCCCTGAGCGCGGTCCGGCCC  
GAGAGTCCGCTGGCCGGCTTCCGCTCCCTCGTGTGTCCCGTGTAGGAG  
GGCCGGCCGAAATGCTTCCGGCTCCCGCTCTGGAGACACGGGCGCGCCC  
CTGCGTGTGGCACGGGCGCGGGAGGGCGTCCCGCGCGCGCTGCTCCC  
GCGTGTCTCCGGGTTGACCAAGAGGGCCCGGGCGCTCCGTGTGGCTGCG  
ATGGTGGCGTTTTGGGACAGGTGTCCGTGTCCGCGCTCGCCCTGGGCGCGGCG  
GCGTGGTCCGTGACGCGACCTCCCGCGCCCGGGGAGGTATACTTCGCTCC  
GAGTCGGCATTGGGCGCGCGGGT 

Figura 3

AGCGTGAGCAGGAGAAATCTGGAGAAACAGATTGTGTTATAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG  
 AAAGAAAGAGAAATCCTTATGTTCTTTGAGCCTCCCCTCCCAGAAATGAGTTCTCTTCCAC  
 GACCTTCTCATTCAACCAATAGACAAGTATTTGGGGGGGGTCAAGTCCAGACGCTTAA  
 AGGTTGAAAGTAAAGTGGTCCGGGAAAGGGGGGACACCGTCTCTCCAGCGCCTTTGG  
 TTCAAACCTCCTCGTGACCTCCCTCCCTCCCTCGTCTTATAAATATAAATAAATCCT  
 AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG  
 CCTAAGAGTCTCGCCTGGTTTCGGCTACGTTCCCTCCCTGACCTCGAAACGTGCCTGAGTCG  
 TCCGGGAGCCCGCGGCGAGCGCACCCCTTCCGGGGCGCAGCGGGCCCGGACGGACG  
 GACGGACGGACGGACGGGTTTTCCAAGGCTCCCGCCCGGGAGGACGGGGTTCCGCGCGGTG  
 CGCGCCGTGTCTCCGGGGCCCTCCGGCCGTCGCCGGCCGAGAGCGAGATCCGAGGCGCCC  
 TGACGGCCTCGCCCGCGGATCTGTCGGCTGTCGGTTCGGCCGGTTGTCGGGTGCCACCTGGCG  
 GCCGCTTTATAGAGCGTGTCCCTCCGGAGGCTCGGCGGACAGGCAAGAAACAGCTTTGGTG  
 TCGGTTTCCGGGCGAGTCCAGGAGAGGGCGGCTCCGGCGCAGCGTCCGGTGTCCGCCG  
 GGGCTCGGCGCGATGCGCTCGCCGGAGATTGGACCTCCGGAGCTCGAGGGAGTGTCCGCCG  
 TCGCCGTGTCCCGCTGTCGCCCTCCGCTCCCGGAGGAGGCCGTGCGGGCCCGCTGGGT  
 GGGTCGACAGCACCCCGGTGGCTCCTCCCGCCCGCGGACCGACTGGCGCCCTCGG  
 GGGCGGGACAGGGTGTCCCGCCGTCCGTCCGTGGCTCCGGCGCATCTCCGGCCCTCCT  
 CCGTGTACTCGGTTGTCTCCGTGTCACGCCCTGGCGACGGGACCGGCTGAGCCTGGAGGG  
 GAAGCCCGTGGTGGCGACAGACCCGGCTCGGGCACGTTGGGGTCCCAGGCGTCCGGAC  
 GCGATTTCTCCCTTGTCCGAGGCCCGCTGCGGAGGTGGTCCCAGGCGGTCCGACCGGGTGC  
 CACCGGGGTGGCGGCCGTCGGTTCGGGCTCCGGCcccgggtgattcccggtaggctgcctctgc  
 cgcggtggccctccactccctggccgagccgggttgaggacggcggttaggcacggggcctctgagggcccgggggg  
 acggcctccgacgggtgctcccgagaactttagatattttcaagtcctctcccgagatcactGGCGTGGCGCGTg  
 GCGGCGTGGCGCGTGGCGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGTATCGCCCCCTCCACCCCCCCC  
 CCCCCCGGGTTACCTGGGGCGACAGAAAGCCCTGGGGGCGGCGTCCGTGGGGTGGG  
 GTGGGGGGCGCGTGGGGCAGGTTTTGGGTACAGTTGGCCGTTGACCGTCCCAGGAGGTCGG  
 GGTGACCTGTGGTCCCGCCCGCGGCGGCTTATTTCTTCCCGGAAATGAACATTTTIG  
TTGCCAGGTAGGTGCTG

Figura 4

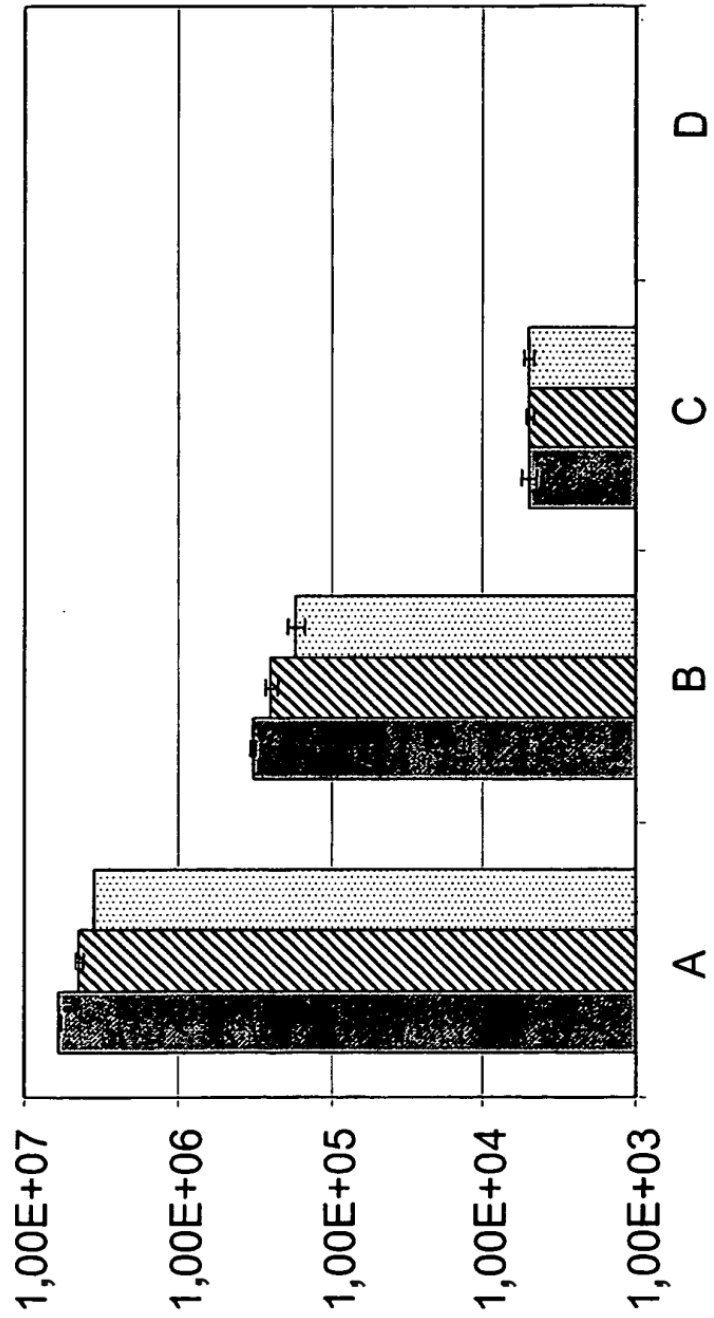


Figura 5

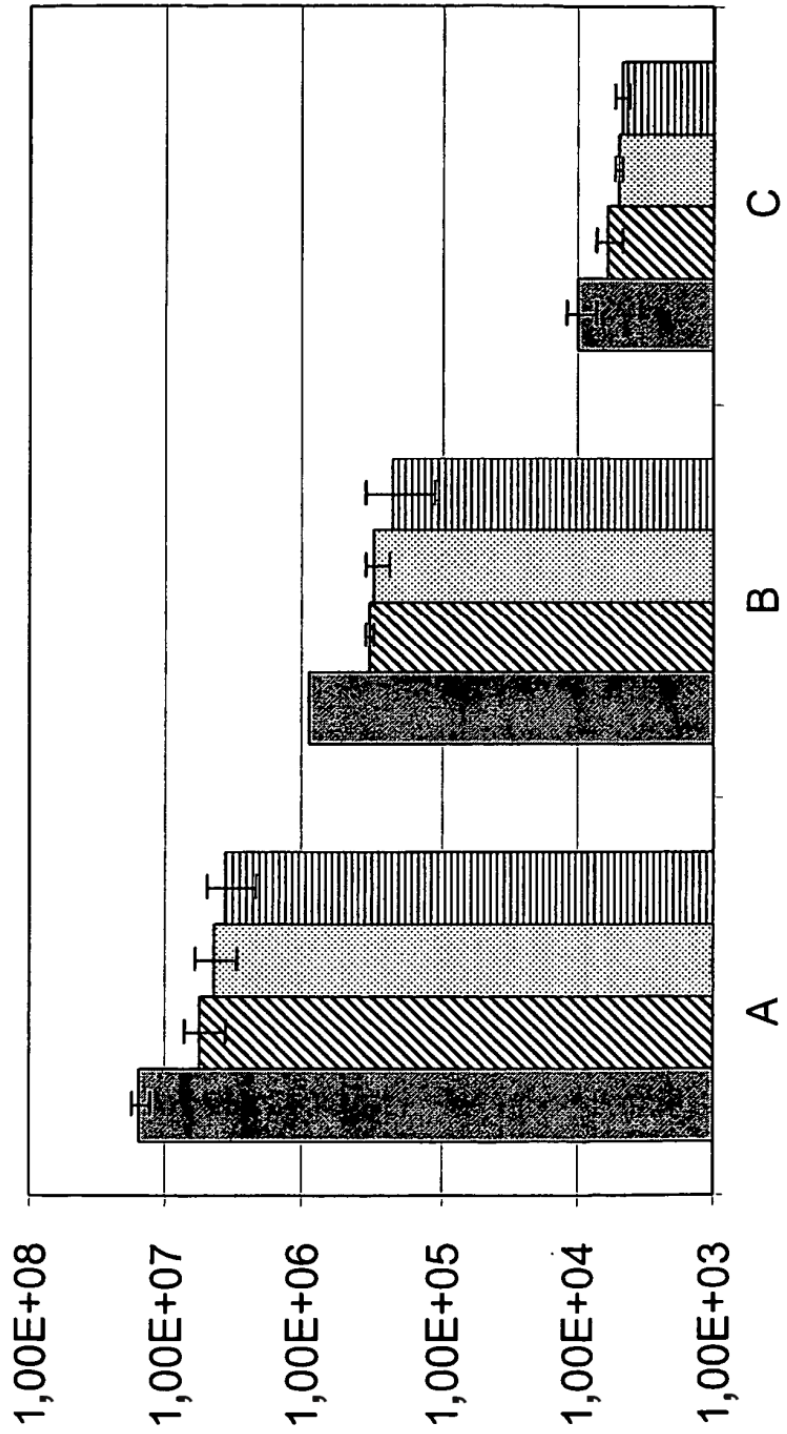


Figura 6

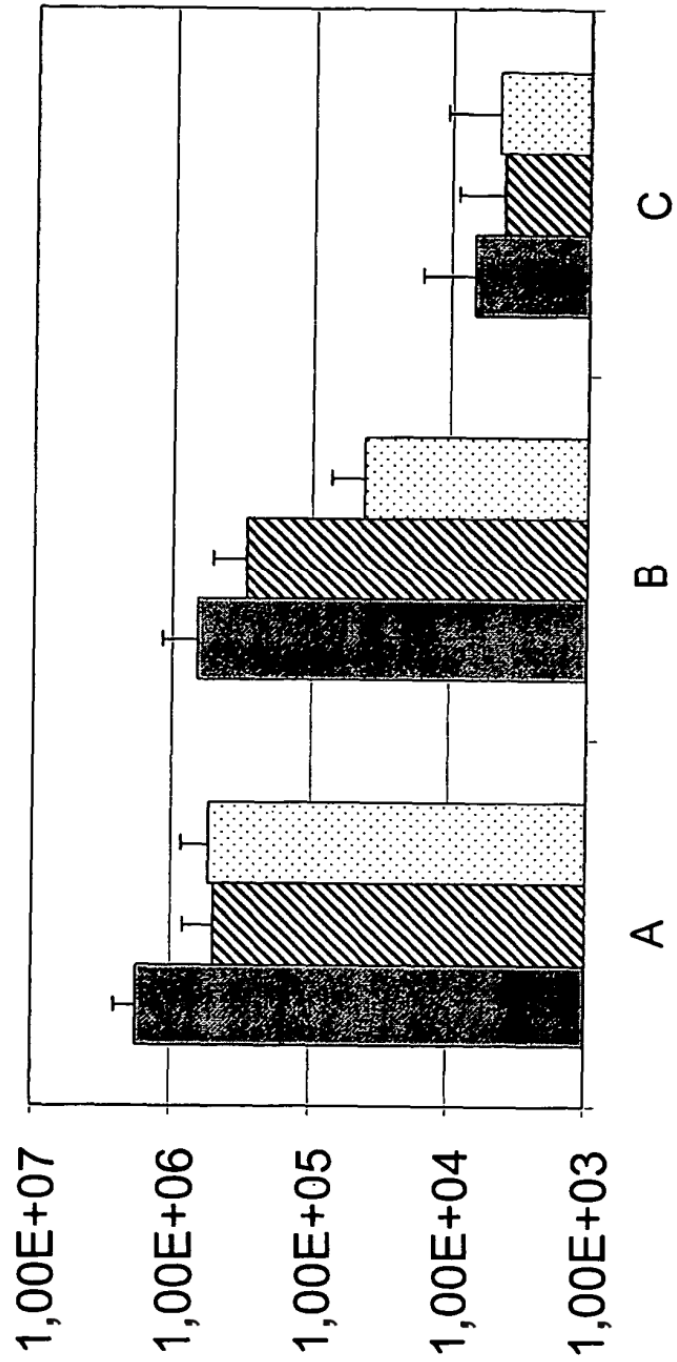
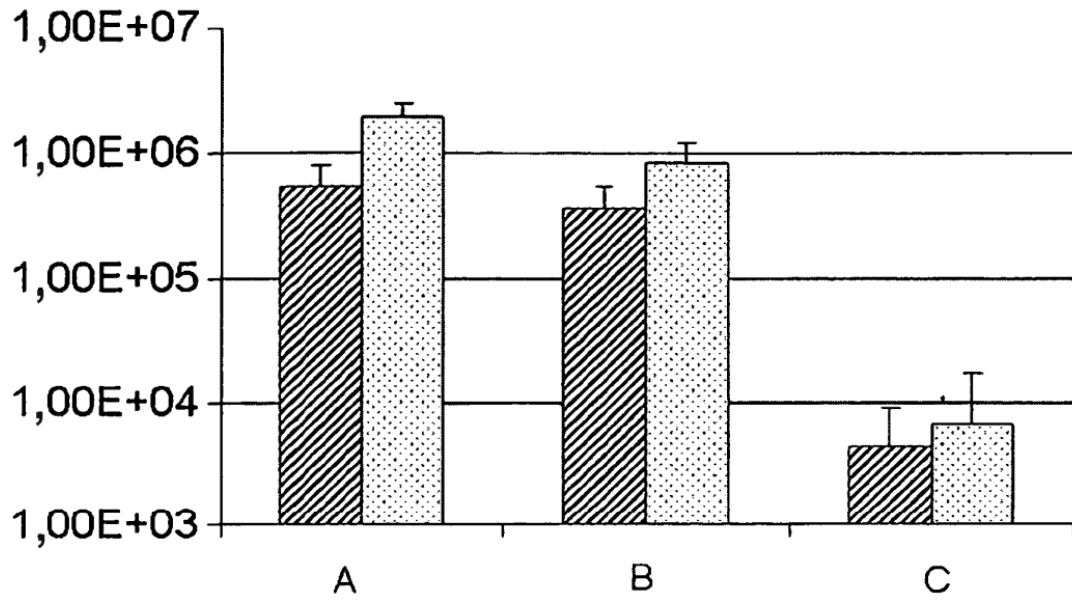




Figura 7

**A**



**B**

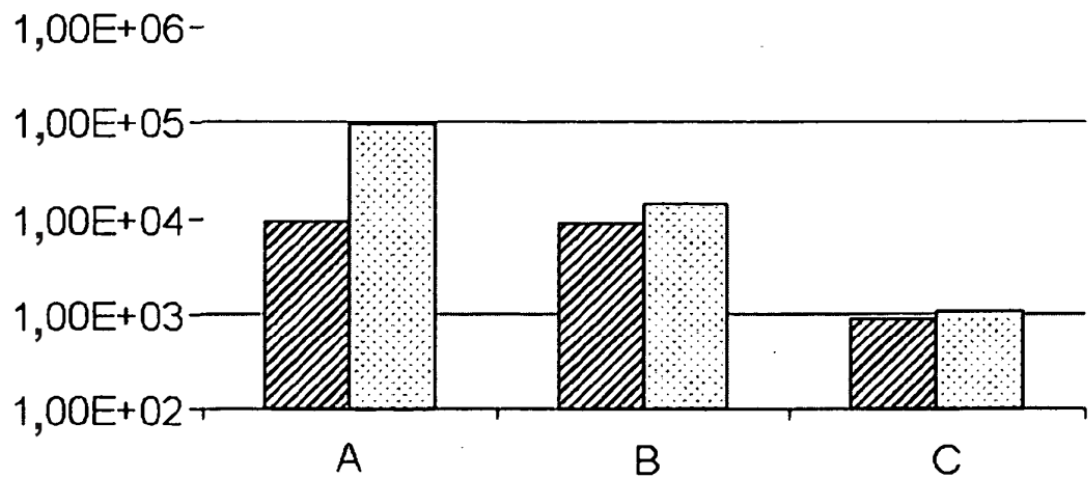


Figura 8

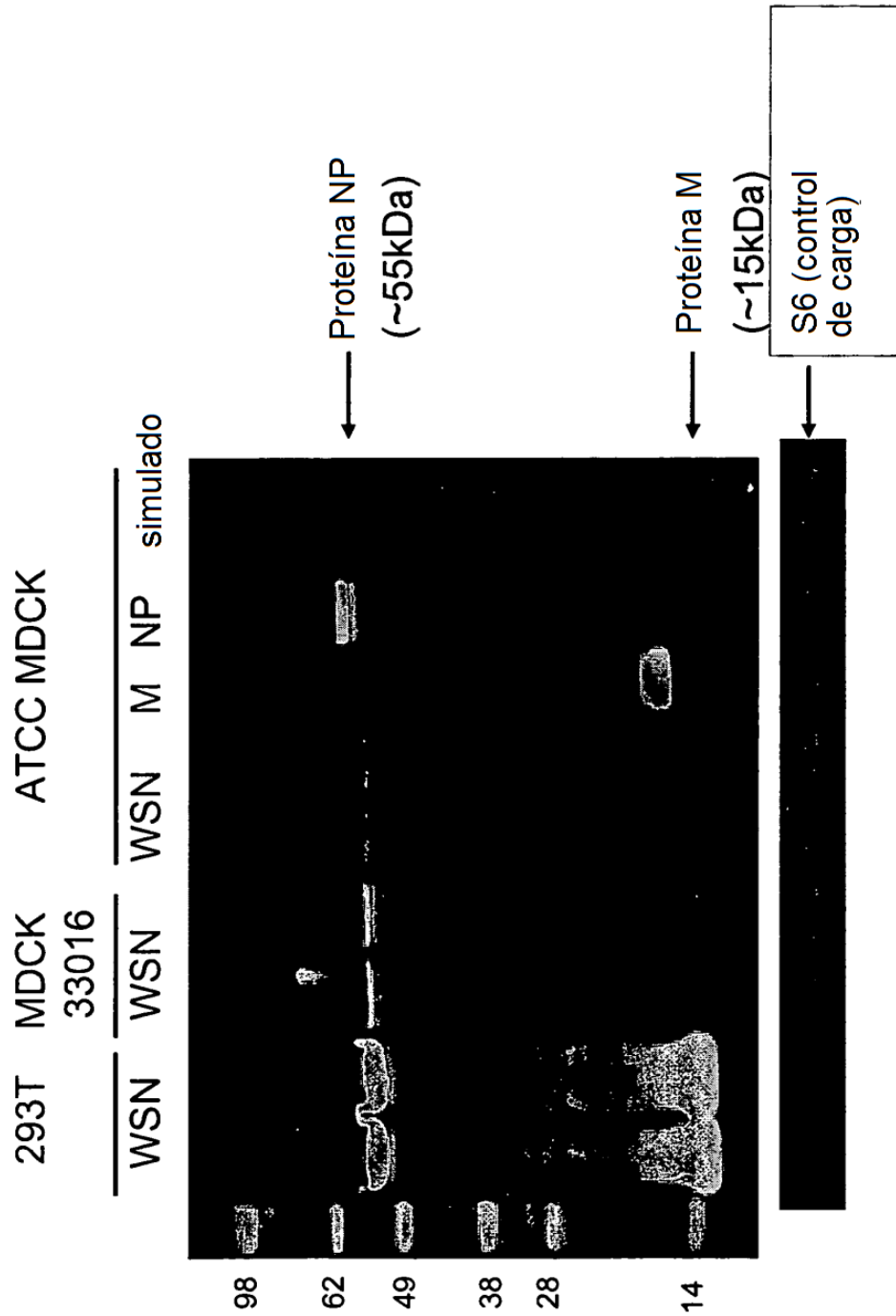


Figura 9

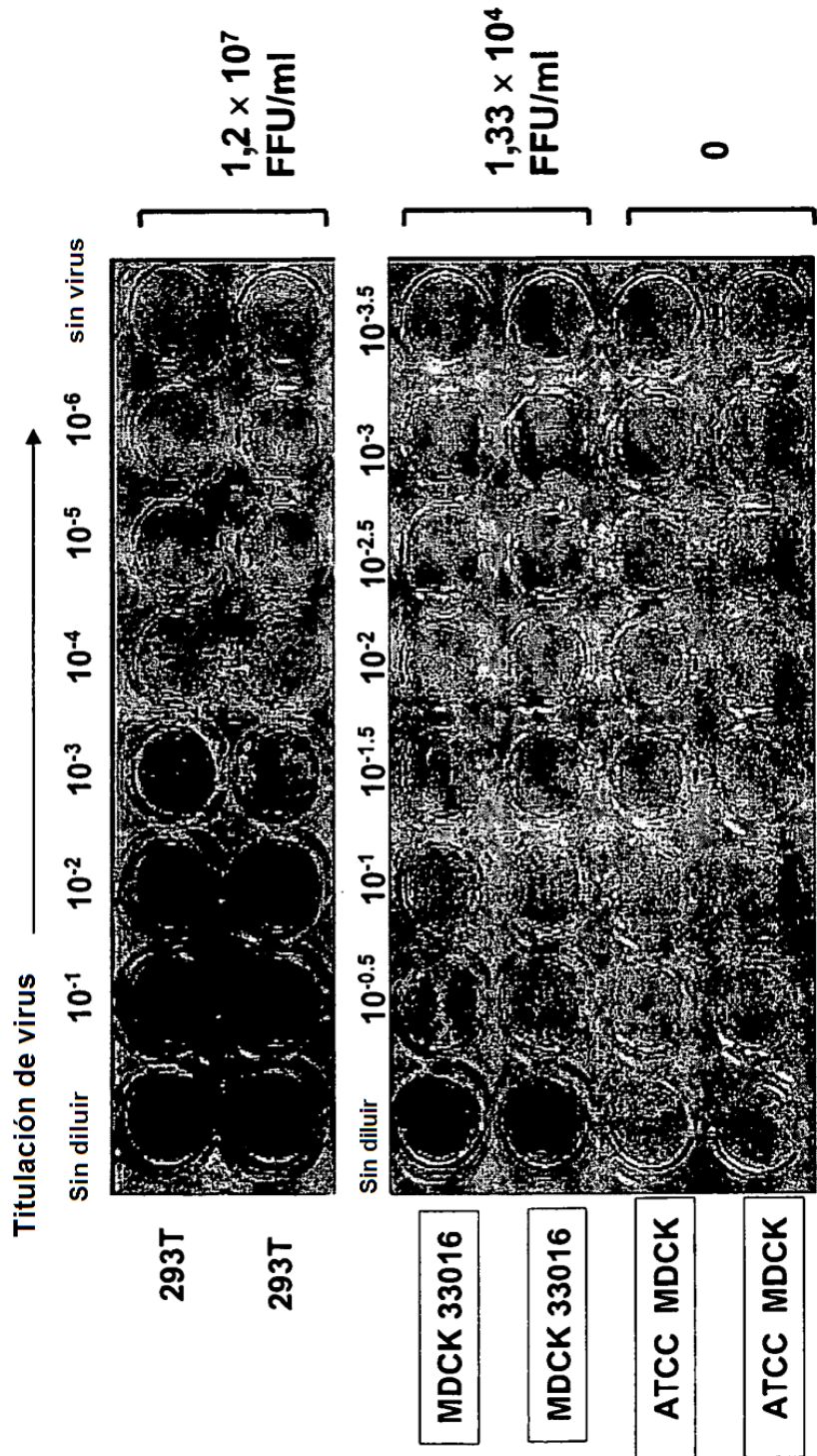




Figura 11

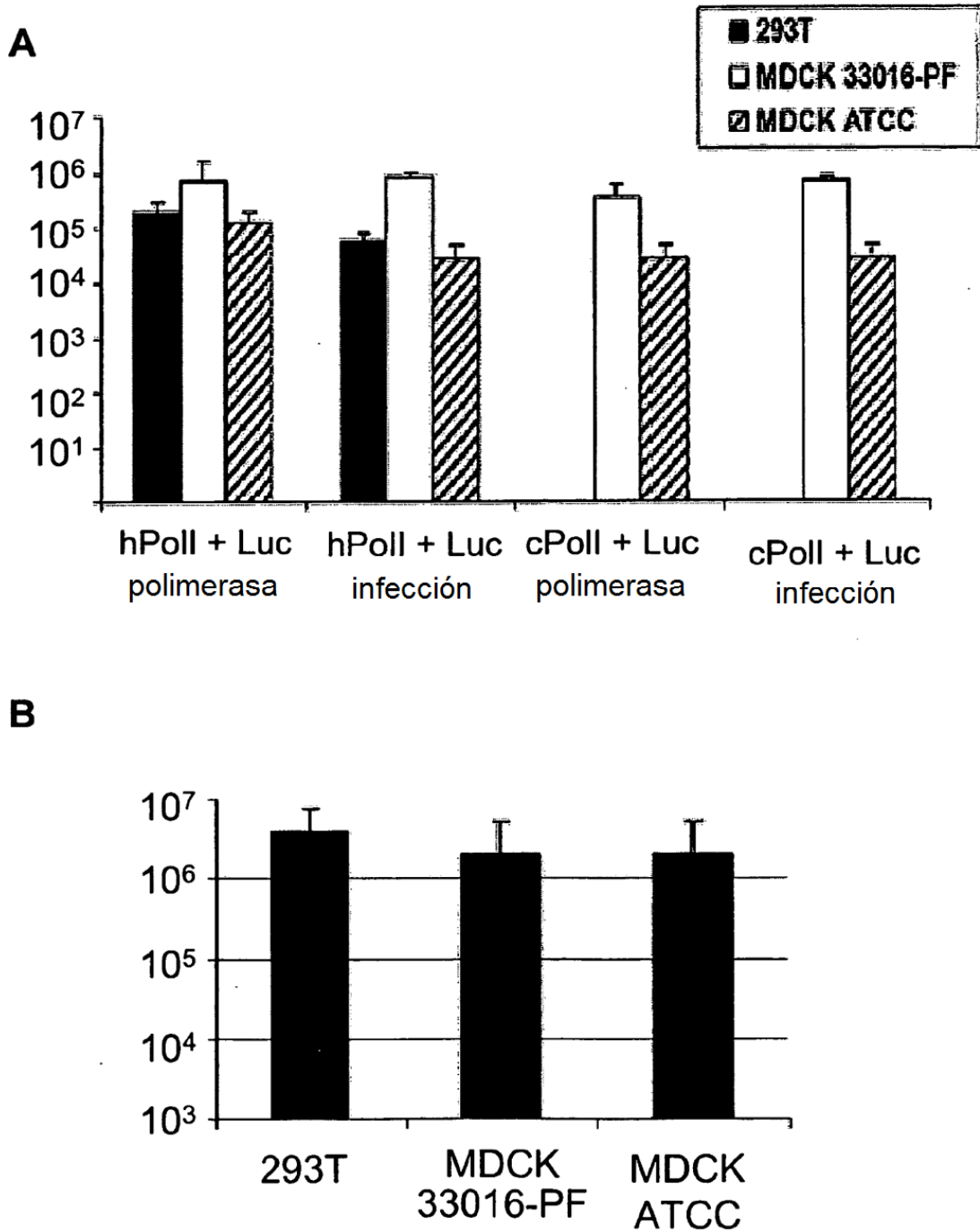
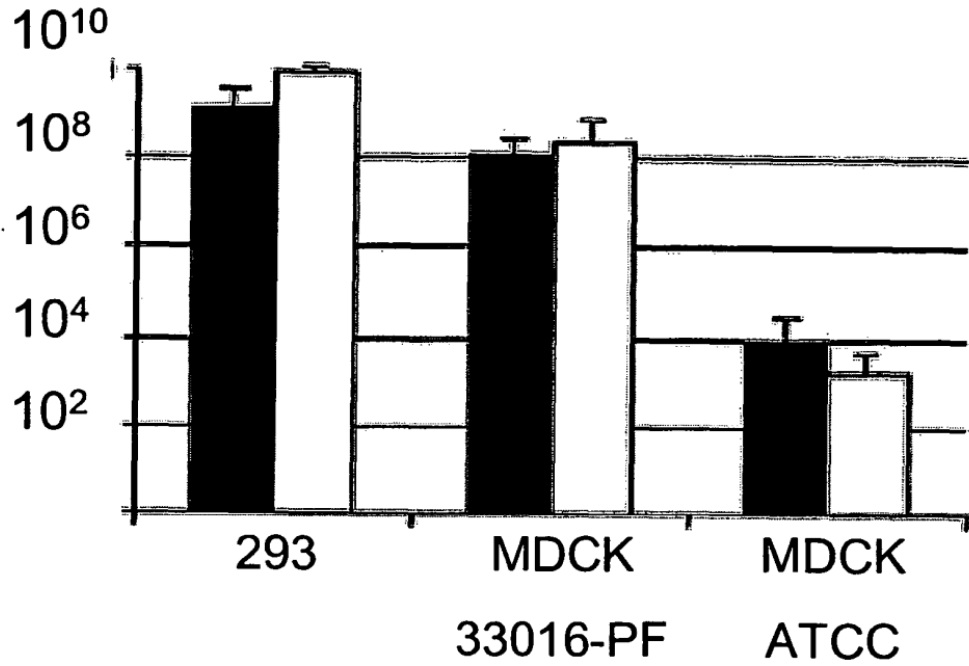


Figura 12

**A**



**B**

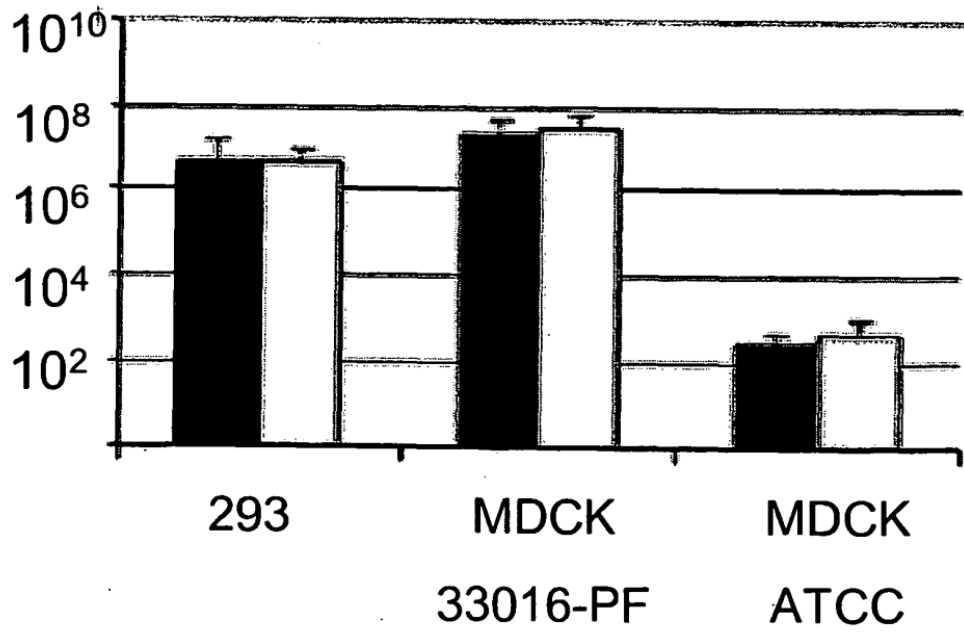


Figura 13

