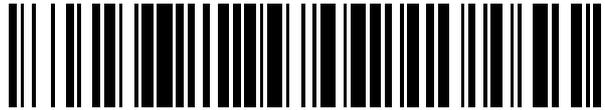


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 813**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005 E 05825287 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1831357**

54 Título: **Obtención de un virus de la gripe**

30 Prioridad:

24.12.2004 EP 04078527
04.01.2005 US 641003 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2013

73 Titular/es:

ABBOTT BIOLOGICALS B.V. (50.0%)
C.J. VAN HOUTENLAAN 36
1381 CP WEESP, NL y
ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (50.0%)

72 Inventor/es:

DE WIT, EMMIE;
SPRONKEN, MONIQUE I.J.;
FOUCHIER, RON A.M. y
OSTERHAUS, ALBERT D.M.E.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 813 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

Obtención de un virus de la gripe

La invención se refiere al campo de la producción de vacunas contra el virus de la gripe.

Los virus de la gripe (*Orthomyxoviridae*) son virus de RNA de cadena negativa con envoltorio con un genoma segmentado (Taubenberger and Layne, *Molecular Diagnosis* Vol. 6 No. 4 2001). Se dividen en dos géneros: uno que incluye los virus de la gripe A y B y el otro que consiste en el virus de la gripe C, basados en diferencias antigénicas significativas entre sus nucleoproteínas y proteínas de la matriz. Los tres tipos de virus difieren también en patogenicidad y organización genómica. El tipo A se encuentra en una amplia gama de animales de sangre caliente, pero los tipos B y C son predominantemente patógenos humanos. Los virus de la gripe A se subdividen además por caracterización antigénica de las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y NA que sobresalen de la superficie del virión. Hay usualmente 15 subtipos de HA y nueve de NA. Los virus de la gripe A infectan una amplia variedad de animales, incluyendo aves, cerdos, caballos, seres humanos y otros mamíferos. Las aves acuáticas sirven como reservorio natural para todos los subtipos conocidos de virus de la gripe A y probablemente son la fuente de material genético para las cepas de la gripe pandémica humana.

A diferencia de los paramixovirus relacionados, los virus de la gripe tienen un genoma de RNA segmentado. Los virus de la gripe A y B tienen una estructura similar, mientras que la del virus de la gripe C es más divergente. Así como los virus de los tipos A y B contienen cada uno ocho segmentos génicos diferenciados que codifican cada uno al menos una proteína, el del tipo C contiene siete segmentos diferenciados, combinando los segmentos 4 y 6 de los tipos A y B. Los virus de la gripe A y B están recubiertos con tres proteínas que sobresalen: HA, NA y de la matriz 2 (M2). Los virus de la gripe C tienen solamente una glicoproteína de superficie. Cada segmento de RNA del virus de la gripe está encapsulado por nucleoproteínas (NP) formando complejos ribonucleótido-nucleoproteína (RNP). Las tres proteínas polimerasas están asociadas a un extremo del complejo RNP. Los RNP están rodeados por una membrana con la proteína de la matriz (matriz 1) como parte integral. La porción de fosfolípido de la envoltorio procede de la membrana de la célula hospedante. También dentro de la partícula viral se encuentra la proteína no estructural 2 (NS2).

Las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la nomenclatura de los virus de la gripe son las siguientes. Primero, se designa el tipo de virus (A, B o C), luego el hospedante (si no es humano), el lugar de aislamiento, el número de aislamiento y el año de aislamiento (separados por barras inclinadas). Para la gripe A, los subtipos HA y NA se anotan entre paréntesis. Por ejemplo, las cepas incluidas en la reciente vacuna trivalente para la temporada 2000 a 2001 son: A/Panamá/2007/99 (H3N2), A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) y B/Yamanashi/16/98. Desde 1977, ha habido dos subtipos de gripe A circulando conjuntamente en los seres humanos: H1N1 y H3N2.

Los virus de la gripe acumulan mutaciones puntuales durante su replicación debido a que su complejo RNA-polimerasa no tiene actividad de corrección. Las mutaciones que cambian aminoácidos en las porciones antigénicas de las glicoproteínas de superficie pueden aportar ventajas selectivas para una cepa viral permitiéndole eludir la inmunidad preexistente. La molécula de HA inicia la infección uniéndose a los receptores en ciertas células hospedantes. Los anticuerpos contra la proteína HA impiden la unión al receptor y son muy eficaces en prevenir la reinfección con la misma cepa. La HA puede eludir la inmunidad previamente adquirida por su deriva antigénica, en la cual las mutaciones del gen HA actualmente circulante evita la unión al anticuerpo, o deriva antigénica, en la cual el virus adquiere HA de un nuevo subtipo. Las presiones de la deriva antigénica no son iguales a través de la molécula de HA, ocurriendo cambios positivamente seleccionados predominantemente en la cabeza globular de la proteína HA. Estos cambios se acumulan también en una mayor extensión en HA que en NA. Los cambios en otras proteínas de un virus de la gripe pueden ocurrir más lentamente. Análogamente, la presión de la deriva antigénica es mayor en las cepas de virus de la gripe adaptadas a los seres humanos, intermedia en las cepas adaptadas a cerdos y equinos, y menor en las cepas adaptadas a las aves.

Debido a que los virus de la gripe tienen un genoma segmentado, la co-infección con dos cepas diferentes en el mismo hospedante puede conducir a la producción de nuevas cepas del virus de la gripe reorganizadas que contengan diferentes combinaciones de segmentos de los genes parentales. Se sabe de la existencia de quince subtipos de HA en aves silvestres que proporcionan una fuente de diversas HA nuevas para los seres humanos. La aparición en la circulación humana de una cepa del virus de la gripe con un nuevo subtipo por la deriva antigénica ha sido la causa de las dos últimas pandemias de gripe en 1957 y 1968 y muy probablemente fue la causa de la pandemia de gripe de 1918. Para estar en concordancia con todo lo que se sabe de los virus pandémicos de la gripe, una cepa pandémica debe tener una HA antigénicamente distinta de la que predomina usualmente; esta HA no puede haber circulado en los seres humanos durante 60 a 70 años; y el virus debe ser transmisible entre seres humanos. Tanto en 1957 como en 1968, las pandemias resultaron de una deriva en la HA, y en ambos casos, las HA de las cepas pandémicas estaban estrechamente relacionadas con las cepas aviarias. Aunque uno de los requisitos absolutos para una pandemia sea que la HA debe cambiar, se desconoce la extensión en la cual puede o debe cambiar el resto del virus. Solamente los virus pandémicos de 1957 y 1968 están disponibles para el estudio directo, mientras que el virus de la gripe pandémica de 1918 está siendo caracterizado usando arqueología molecular. En 1957, tres genes fueron reemplazados por genes similares de aves: el HA, el NA, y una subunidad del

complejo de polimerasa (PB1). En 1968, solamente fueron reemplazados el HA y PB1.

Un diagnóstico específico de infección por gripe se puede hacer por aislamiento del virus, ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI), detección de antígenos por inmunoensayos, ensayos serológicos, demostración de actividad de NA en secreciones, o ensayos basados en moléculas. Las muestras pueden ser recogidas en forma de esputos, exudado nasofaríngeo o lavado nasofaríngeo obtenido por gárgaras con una solución salina tamponada. El patrón para la diagnosis de la gripe ha sido la caracterización inmunológica después del cultivo. El análisis serológico proporciona un método seguro pero retrospectivo para la infección por gripe debido a que requiere la recogida de sueros tanto de pacientes graves como convalecientes.

Los virus de la gripe pueden ser cultivados en huevos de gallina embrionados o en cierto número de sistemas de cultivo de tejidos. La adición de tripsina (para la activación de la escisión de HA) permite la propagación de un virus de la gripe en células de riñón canino Madin-Darby (abreviadamente en lo sucesivo MDCK por la expresión inglesa *Madin-Darby Canine Kidney*) y otras líneas. El método principal para la producción de vacunas es todavía el cultivo de virus de la gripe en huevos. El cultivo en líneas celulares se usa comúnmente para el aislamiento primario de los virus de la gripe humana (tanto de tipo A como B). Muchos virus de la gripe humana se pueden cultivar directamente en la cavidad alantoidea de huevos embrionados. Algunos virus de la gripe A y B requieren el cultivo inicial en la cavidad amniótica y la subsiguiente adaptación a la cavidad alantoidea. Después del aislamiento del cultivo, la mayoría de los aislados de la gripe se identifican definitivamente usando inmunoensayos o inmunofluorescencia. Las moléculas de HA de los virus de la gripe se unen a residuos de ácido siálico en la superficie de las células respiratorias para que el virus consiga la entrada.

Las cepas del virus de la gripe pueden ser caracterizadas antigénicamente aprovechando la capacidad de los virus de la gripe de aglutinar eritrocitos *in vitro*. Los anticuerpos anti-HA pueden inhibir la aglutinación. Por tanto, un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) es uno de los métodos estándares usado para caracterizar cepas del virus de la gripe. Los ensayos de HI se usan para determinar si las cepas de muestra están relacionadas inmunológicamente (es decir, presentan reacción cruzada) con cepas de vacunas recientes. Sueros de tipificación, generalmente producidos en hurones, se añaden a pocillos en una serie de diluciones 1/2, y los técnicos de laboratorio puntúan los pocillos de ensayo buscando los eritrocitos en suspensión frente a los aglutinados. En la mayoría de los casos se usa un panel de sueros para comparar las cepas de muestra contra la vacuna con las cepas de referencia, y durante cualquier temporada dada de gripe, la gran mayoría de las cepas de muestra se compara satisfactoriamente por ensayos de HI. La OMS proporciona directrices y los centros colaboradores de la OMS proporcionan asesoramiento para la identificación de características antigénicas de cepas virales individuales y pueden proporcionar estas cepas a quienes deseen obtenerlas. Las cepas de muestra se clasifican de acuerdo con la genealogía inmunológica, tales como los virus similares a A/Moscú/10/99 (H3N2), A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), y B/Pekín/184/93. Para cepas de muestra que no se pueden caracterizar en ensayos de HI, los técnicos de laboratorio deben inocularlas en hurones para producir un antisuero específico de la cepa. Cuando está listo el nuevo antisuero, se realizan de nuevo los ensayos de HI como se ha descrito. Si el nuevo suero muestra huecos significativos en la reactividad cruzada (usualmente definida como una diferencia de cuatro veces entre la cepa de muestra y la de vacuna), se incorpora en el panel de laboratorio de rutina y se usa para buscar nuevas cepas epidémicas. Por tanto, los ensayos de HI son extremadamente importantes en los esfuerzos de vigilancia del virus de la gripe para la selección de la cepa vacunal y son los métodos más comúnmente usados para determinar la deriva antigénica.

Las cepas del virus de la gripe pueden ser caracterizadas genéticamente por comparación de secuencias de los segmentos génicos individuales, y de nuevo las directrices de la OMS y de los centros colaboradores de la OMS proporcionan asesoramiento para la identificación de la identidad individual de los segmentos de RNA que comprenden el genoma del virus de la gripe; los segmentos de ácidos nucleicos de los virus de la gripe A y B que codifican la nucleoproteína (NP), la polimerasa básica 1 (PB1), la polimerasa básica 2 (PB2), la polimerasa ácida (PA), la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA), las proteínas de la matriz (M1 y M2) y las proteínas no estructurales (NS1 y NS2), y los segmentos de ácido nucleico del virus de la gripe C que codifican la nucleoproteína (NP), la polimerasa básica 1 (PB1), la polimerasa básica 2 (PB2), la glicoproteína similar a la hemaglutinina-neuraminidasa (HN), las proteínas de la matriz (M1 y M2) y las proteínas no estructurales (NS1 y NS2).

Las peticiones de cepas de referencia, por ejemplo, para análisis antigénico, para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos y para identificar virus vacunales pueden ser dirigidas al *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza*, 45 Poplar Road, Parkville, Victoria 3052, Australia (fax: +61 3 9389 1881, página web: <http://www.influenza.centre.org>); al *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, National Institute of Infectious Diseases*, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan (fax: +81 42 5610812 o +81 42 5652498); al *WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, Centers for Disease Control and Prevention*, 1600 Clifton Road, Mail stop G16, Atlanta, GA 30333, United States of America (fax: +1 404 639 23 34); o al *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, England* (fax: +44 208 906 4477). La información epidemiológica actualizada está disponible en la página web de la OMS <http://www.who.int/influenza> y el sistema de información geográfica, FluNet, en la página web <http://www.who.int/flunet>. Están creciendo el interés del impacto de la gripe y los beneficios sanitarios y económicos que su prevención trae consigo, y la pasada década ha visto el uso y beneficio de la vacunación y el aumento considerable del número de fármacos anti-gripe. Como resultado de

la mayor expectativa de vida en muchos países, mucha más gente está en riesgo de sufrir complicaciones, la carga de los sistemas sanitarios durante las epidemias de gripe, es más ampliamente reconocida y los viajes internacionales más frecuentes han creado oportunidades para la propagación del virus, al mismo tiempo que la introducción de nuevos productos ha aumentado las opciones para la prevención y tratamiento de la enfermedad.

5 Alrededor de 50 países han establecido programas nacionales de inmunización contra la gripe financiado por los gobiernos y en muchos otros la vacuna está disponible. Las recomendaciones específicas para el uso de la vacuna varían, pero generalmente implican inmunización anual de los individuos de edad avanzada y de los mayores de 6 meses que tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad grave debido a una enfermedad crónica pre-existente. En algunos países, la vacuna se usa para reducir la propagación de la gripe a los que tienen mayor riesgo médico. Los

10 estados miembros necesitan considerar el beneficio de las actividades de prevención de la gripe en el contexto de sus prioridades de salud pública global.

Las vacunas inactivadas se clasifican en diversos tipos, dependiendo de si contienen partículas de virus completos, partículas de virus parcialmente fragmentados (vacunas fraccionadas) o antígenos de la envoltura purificados (vacunas de subunidades). Algunas vacunas de subunidades han sido combinadas con un sistema adyuvante o de

15 administración.

Algunos países han autorizado vacunas con vivos atenuados contra la gripe para ciertos grupos diana. En la Federación Rusa se han usado dos diferentes formulaciones de una vacuna en adultos y en niños sanos, y otra vacuna de virus vivo ha sido ensayada extensivamente pero todavía no ha sido autorizada. Hasta que las vacunas de virus vivos atenuados estén más ampliamente disponibles, no serán generalmente recomendadas para la

20 prevención de la gripe.

Se han desarrollado dos clases de agentes antivirales para la prevención y tratamiento de la gripe. Los inhibidores de M2, amantadina y rimantadina, están limitados al tratamiento de los virus de la gripe A y también se ha descrito que son eficaces en la prevención de la infección. Aunque ambos productos causan algunos efectos secundarios, es con la amantadina con la que son más comunes algunos efectos secundarios neurológicos significativos. Los

25 inhibidores de neuraminidasa, tales como zanamivir y oseltamivir, han sido autorizados recientemente para el tratamiento de los tipos de la gripe A y B en varios países, y se han descrito que son eficaces para la profilaxis. Se han detectado mutantes resistentes en pacientes que recibieron ambas clases de agentes antivirales. Aunque corrientemente esto no se considera un problema de salud pública importante, la situación puede cambiar si estos fármacos se usan a una escala muy grande.

La OMS mantiene un programa internacional de vigilancia internacional global puesto en práctica con la cooperación de 110 centros nacionales de gripe situados en 82 países y 4 centros colaboradores de la OMS para referencia e investigación sobre la gripe situados en Atlanta (Estados Unidos), Londres (Reino Unido), Melbourne (Australia) y Tokio (Japón). Estos centros proporcionan un sistema de aviso temprano para cepas emergentes con potencial

30 epidémico. Este sistema es importante porque la eficacia de las vacunas contra la gripe se reduce si no contienen las cepas actualmente circulantes. La OMS publica recomendaciones para la composición de las vacunas, que se pueden encontrar en el *Weekly Epidemiological Record* (véase por ejemplo el número 9, 2004, 79, página 88 o <http://www.who.int/wer>) publicado por la Organización Mundial de la Salud, en febrero para vacunas usadas en el hemisferio norte y en septiembre para vacunas usadas en el hemisferio sur. Puesto que la gripe tiene modelos estacionales menos definidos en las regiones ecuatoriales, las consideraciones epidemiológicas tendrán influencia

35 en cuál de estas recomendaciones (febrero o septiembre) sea la apropiada para vacunas de uso en países ecuatoriales.

Los centros colaboradores llevan a cabo análisis antigénicos y genéticos de aislados de gripe presentados por los centros nacionales. Cuando se tienen pruebas de una variación antigénica, ésta es recopilada con datos epidemiológicos para determinar el significado epidemiológico de las variantes. Los aislados representativos se

45 comparan con las cepas vacunales actuales usando paneles de sueros humanos recogidos antes y después de la vacunación, para determinar si podría esperarse que las vacunas actuales protejan contra estos virus. Después de la publicación de las recomendaciones anuales de vacunas de la OMS, se desarrollan cepas de alto crecimiento y se proporcionan a los fabricantes como virus de referencia para ayudar a la generación de virus de siembra para la producción de vacunas. Los ensayos de seguridad y potencia de las vacunas contra la gripe incluyen inactivación de virus, esterilidad microbiana, medida de los productos químicos usados para romper el virus y confirmación de la concentración de antígeno recomendada. Se recomienda que las vacunas cumplan con los requisitos de la OMS, sin embargo las autoridades nacionales de control deben aprobar los virus vacunales específicos usados en cada país. Las autoridades sanitarias nacionales son responsables de las recomendaciones referentes al uso de la vacuna. Además la OMS ha publicado recomendaciones sobre la prevención de infecciones por virus de la gripe (Véase WER No. 35, 2002, pp. 281-288.) Las vacunas contra la gripe se han producido en huevos de gallina embrionados durante más de 50 años, pero recientemente se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar sistemas de cultivos celulares para la producción de vacunas. La metodología estándar convencional en huevos de gallina embrionados es extremadamente engorrosa y tiene importantes desventajas: se requieren millones de huevos; en EE.UU. se deben inocular y recolectar individualmente más de 100 millones por temporada; se requiere una purificación exhaustiva con varias etapas de filtración y centrifugación para asegurar que la proteína del huevo

50 minimiza el riesgo de alergias; se requieren muchas etapas de producción que son difíciles de automatizar y exigen un gran trabajo, y ni que decir tiene tiempo y el proceso está sometido a posible contaminación.

60

Por tanto ha habido una necesidad largo tiempo sentida en la industria de desarrollar tecnologías de producción de vacunas que demuestren ventajas sobre la tecnología actual de producción de vacunas, es decir, desarrollar protocolos de fabricación que utilicen cepas especiales de células capaces de mantener el crecimiento de un virus de la gripe y que estén adaptadas al crecimiento en bio-reactores automatizados, en bio-vehículos o en otros sistemas de cultivos celulares para reemplazar la metodología existente para la fabricación de vacunas.

Frecuentemente se sugieren, para uso en la producción de vacunas contra el virus de la gripe, líneas celulares continuas bien caracterizadas, tales como células VERO u otras células de origen primate. Sin embargo, actualmente las autoridades de registro de medicamentos evitan las vacunas producidas en células de primates que están destinadas a uso humano. Cada vez más, dichas autoridades recomiendan que todos los productos derivados de células de primates (tal como las VERO) estén exentos de células residuales intactas y expresan continuamente su preocupación por el nivel de material residual, tal como el DNA de células de primate en los productos fabricados en estas células. Aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente acepta un límite de DNA residual a partir de líneas celulares continuas de 10 ng por dosis de vacunas virales cuando se administran parenteralmente, las autoridades de registro continúan considerando el nivel de riesgo planteado por el material celular residual de primate, tal como DNA caso por caso para vacunas virales.

Durante mucho tiempo la investigación fundamental de los virus de la gripe A ha estado impedida por la falta de disponibilidad de sistemas genéticos inversos eficientes. Aunque las técnicas genéticas inversas más antiguas para los virus de RNA de cadena negativa se desarrollaron de hecho para el virus de la gripe A, la obtención de este virus exclusivamente a partir de DNA recombinante se consiguió sólo recientemente. El virus recombinante de la gripe se produjo por transfección de células eucariotas con un conjunto de ocho plásmidos a partir de los cuales cada uno de los segmentos de RNA virales genómicos (vRNA) fue transcrito por RNA-polimerasa I y un conjunto de cuatro plásmidos adicionales que expresan la nucleoproteína (NP) y las proteínas polimerasas PB1, PB2 y PA. Las eficiencias descritas de la producción de virus usando estos sistemas de 12 plásmidos fueron relativamente bajas.

Por la co-expresión de cinco plásmidos adicionales que codifican la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA), las proteínas de la matriz 1 y 2 (M1 y M2) y la proteína no estructural 2 (NS2), podrían aumentarse los títulos de virus en los líquidos sobrenadantes. Una modificación elegante de estos sistemas de 12 y 17 plásmidos es la implementación de vectores bidireccionales para reducir a ocho el número de plásmidos transfectados. Con este sistema, el vRNA de cadena negativa y el mRNA de cadena positiva pueden ser sintetizados a partir del mismo plásmido.

La capacidad de producir el virus de la gripe recombinante A facilita la investigación futura del virus de la gripe, sin embargo, no se ha encontrado todavía una solución práctica para usar el virus recombinante de la gripe A obtenido por técnicas genéticas inversas para títulos suficientemente altos en la producción de vacunas, debido al hecho de que la mayoría, si no todos, los sistemas celulares usados en la producción de vacunas no permiten o solamente permiten muy poca replicación de los virus recombinantes antes descritos, debido a la incompatibilidad entre las polimerasas implicadas en los sistemas genéticos inversos y las especies celulares más frecuentemente usadas.

El virus de la gripe A es un virus de RNA de cadena negativa. Esto significa que en un ciclo de replicación, se producen tres tipos de RNA: vRNA de sentido negativo, cRNA de sentido positivo y mRNA de sentido positivo. A diferencia del RNA viral (vRNA), el mRNA está protegido en sus extremos y tiene un cola de poli(A). Los primeros residuos de A de las colas de poli(A) de los mRNA se aparean con un tramo corto de residuos de U en el genoma que se considera como la señal de detención de la transcripción/poliadenilación. Se cree que la polimerasa cuando alcanza este tramo de residuos de U experimenta ciclos repetidos de retrodeslizamiento y de este modo crea la cola de poli(A) completa del mRNA.

Sumario de la invención

La invención proporciona un sistema genético inverso para el virus de la gripe que puede aplicarse a tipos celulares de diferentes especies. La polimerasa I es una enzima nucleolar que transcribe el RNA ribosómico y se expresa abundantemente en las células en crecimiento. El rRNA, como el vRNA, no tiene protección en sus extremos ni cola de poli(A) y por tanto la polimerasa I puede ser usada para la producción de vRNA a partir de cDNA. La transcripción del cDNA viral por la polimerasa I permite la generación de los RNA similares a los de los virus con los extremos 5' y 3' correctos. Sin embargo, mientras que la maquinaria de transcripción de la polimerasa II es frecuentemente compatible con genes de diferentes especies, la transcripción de la polimerasa I exhibe especificidad de especies rigurosa, pero no absoluta. Esta especificidad de especies es conferida por la interacción de los factores de transcripción con el promotor y, en un menor grado, por las interacciones proteína-proteína entre los factores. La especificidad de especies de los sistemas genéticos inversos basados en la polimerasa I es un desventaja importante para el desarrollo de vacunas, debido a que no han sido descritos todavía los promotores de la polimerasa I para especies celulares distintas de la humana, tal como un promotor de la polimerasa I, aun cuando en la industria se usan con frecuencia células caninas (es decir, células de riñón canino de Madin Darby (MDCK)) o aviáres (fibroblasto de embrión de pollo (CEF)) bien definidas para la producción de la vacuna contra el virus de la gripe.

La invención proporciona un ácido nucleico que comprende un segmento del gen del virus de la gripe y un promotor de la polimerasa del bacteriófago T7, en donde dicho ácido nucleico ha sido provisto de al menos un residuo de

guanina adicional próximo a dicho promotor, o un ácido nucleico que comprende el complemento de un segmento del gen del virus de la gripe y un promotor de la polimerasa del bacteriófago T7, en donde dicho ácido nucleico ha sido provisto de al menos un residuo de guanina adicional próximo a dicho promotor.

5 Contrariamente al hallazgo de Neumann & Kawakura (*Virology*, 287, 243-240, 2001) que indica que en contraste con los virus no segmentados, una notable excepción, en la que se pensó que no actuaba la polimerasa de T7, era el virus de la gripe, cuya generación implica la complejidad añadida de las síntesis de ocho RNA virales, además de la polimerasa y la nucleoproteína procedentes del cDNA clonado, la invención proporciona una flexibilidad significativa con respecto a los vectores plasmídicos para esta tecnología genética inversa basada en polimerasa de bacteriófago, y los elementos que contienen. Por ejemplo, los inventores usamos la RNA-polimerasa del bacteriófago T7 para producir vRNA o moléculas de RNA similares al cRNA, pero pueden usarse otras varias RNA-polimerasas, tales como la RNA-polimerasa del bacteriófago SP6. En una realización preferida, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende un segmento génico del virus de la gripe y un promotor de T7 o una cadena complementaria de dicho ácido nucleico. Especialmente en un sistema bidireccional, se prefiere que un ácido nucleico de acuerdo con la invención no comprenda un terminador de T7. Debido a que la polimerasa se expresa preferiblemente en un plásmido transfectado junto con los plásmidos que expresan el virus, el sistema proporcionado en la presente invención no está restringido a una determinada especie. Aunque los sistemas genéticos inversos basados en la polimerasa de T7 se usan a veces para la obtención de virus de cadena negativa no segmentados, nunca se ha utilizado satisfactoriamente hasta ahora un sistema genético inverso para el virus de la gripe segmentado basado en la tecnología de polimerasa de bacteriófagos. Algunas veces se busca superar un factor limitante en los sistemas genéticos inversos que usan polimerasa de T7 para transcribir el cDNA introduciendo residuos de G en el sitio de iniciación de la transcripción para potenciar la transcripción realizada por la polimerasa de T7. Este método se ha usado en la obtención de, por ejemplo, RV, VSV y SV, sin embargo, Zobel et al., (*Virology*, 1994 Jul; 202(1):477-9; *Nucleic Acid Res.* 1993 Aug 11;21(16):3607-14) especifican que tanto el extremo 5' como el 3' de un segmento génico del virus de la gripe A necesitan estar definidos precisamente para que la polimerasa viral funcione apropiadamente; por tanto dichos autores no dejan aparentemente ningún margen para la adición de nucleótidos adicionales en los sitios de transcripción y están en contra la introducción de residuos de G en el sitio de iniciación de la transcripción. Sorprendentemente, sin embargo, en una realización preferida de la invención, los inventores proporcionaron un ácido nucleico particular de acuerdo con la invención que había sido provisto de al menos un residuo de guanina adicional próximo al promotor de T7, y es incluso preferido que se coloquen dos residuos de guanina adicionales próximos al promotor de T7. Además, la invención proporciona una célula de riñón canina Madin Darby (MDCK) o fibroblasto de embrión de pollo (CEF) provista de polimerasa de T7. En particular, la invención proporciona una célula provista de al menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención. La invención facilita el uso de un sistema multi-plásmido, tal como un sistema de 17 plásmidos o de 12 plásmidos o de 8 plásmidos, y, debido a que la invención proporciona una célula con un ácido nucleico de acuerdo con la invención provista adicionalmente de polimerasa de T7, preferiblemente expresada en un plásmido transfectado junto con uno o más de los plásmidos capaces de expresar un segmento génico de virus de la gripe de acuerdo con la invención, el sistema no está restringido a determinadas especies. También se facilita en la presente invención el uso de una célula de acuerdo con la invención en donde dicha polimerasa de T7 comprende una señal de localización nuclear. En una realización preferida, una célula como la proporcionada en la invención es una célula que no es de primate, evitando con ello la introducción de DNA de primate en el material celular o la vacuna procedente de un ácido nucleico o célula de acuerdo con la invención. Preferiblemente se usa una célula de MDCK o una célula CEF. Es una ventaja de la invención que no se requieran virus auxiliares para el sistema genético inverso, comprendiendo todas las partículas virales proporcionadas por la transfección el ácido nucleico deseado y pudiendo usarse sin métodos de clonación complicados en un sistema de producción de vacunas subsiguiente. La invención proporciona también por primera vez una partícula viral replicable que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. En la patente de EE.UU. Nº 5.166.057, no ha sido proporcionada dicha partícula viral capaz de replicación y otros intentos de utilizar el sistema T7 para el virus de la gripe segmentado han sido infructuosos hasta esta invención. 55 Las composiciones de cultivo celular con títulos de virus de $\sim 10^4$ de la partícula viral como es proporcionada en la invención, pueden ser obtenidas fácilmente sin replicación del virus en el cultivo de células transfectadas que pueden ser aumentados hasta $>10^7$ cuando se deja replicar al virus. Es particularmente útil que la replicación de una partícula de acuerdo con la invención se consiga sin un virus auxiliar. Dicha composición de cultivo celular que comprende una célula o material procedente de una célula de acuerdo con la invención o un virus o material procedente de una partícula viral de acuerdo con la invención se puede usar ventajosamente para la producción de una composición farmacéutica dirigida a generar protección inmunológica contra la infección de un sujeto por un virus de la gripe. Ciertamente, dichas células, como las proporcionadas en la invención, no han sido proporcionadas en la patente de EE.UU. 5.166.057. Por tanto, la invención también proporciona un método para producir una partícula del virus de la gripe replicable que comprende cultivar una célula con al menos un ácido nucleico de 60 acuerdo con la invención. Dicho al menos un ácido nucleico usado en dicho método comprende siete u ocho

segmentos génicos de un virus de la gripe y un promotor de polimerasa de bacteriófago o una cadena complementaria de dicho ácido o ácidos nucleicos. Se prefiere además que dicho segmento no comprenda un terminador de polimerasa de bacteriófago, por lo cual ventajosamente dicho segmento ha sido provisto de al menos un residuo de guanina adicional próximo al promotor, o ha sido provisto con dos residuos de guanina adicionales próximos al promotor. Preferiblemente, dichos segmentos proceden de un virus de la gripe recomendado por la OMS para fines vacunales, por ejemplo un segmento de un gen de la gripe A. Finalmente, la invención proporciona una partícula de virus de la gripe replicable, obtenible con el método descrito anteriormente. Con esto la invención se puede usar para generar protección inmunológica contra la infección de un sujeto por un virus de la gripe que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición como la proporcionada por la invención. Dichas composiciones se formulan preferiblemente como una vacuna, es decir, mezclando las partículas virales o las proteínas virales procedentes de dichas partículas (vacunas subunitarias) con un vehículo farmacéutico apropiado, tal como una solución salina o adyuvante (por ejemplo, una sal de aluminio u otro excipiente usualmente empleado) (véase por ejemplo <http://www.odc.gov/nip/publications/pink/Appendices/A/Excipient.pdf>)

Leyendas de las figuras de los dibujos

Fig. 1. Construcciones usadas para el sistema genético inverso basado en polimerasa de T7 (abreviadamente a veces en lo sucesivo T7pol). Véase texto para detalles sobre las estrategias de clonación.

Fig. 2. Análisis por clasificación de células activadas por fluorescencia (abreviadamente en lo sucesivo FACS por la expresión inglesa *Fluorescence Activated Cell Sorting*) de células 293T transfectadas con construcciones que codifican minigenomas de la GFP (0,6 µg), polimerasa de T7 (0,6 µg) y genes de polimerasa del virus de la gripe A (cada uno 1 µg). Panel izquierdo: % de células positivas a la GFP 30 horas después de la transfección. Panel derecho: nivel de expresión de la GFP (fluorescencia media) en la fracción positiva a la GFP. En el eje X se muestran las construcciones de los minigenomas de la GFP transfectados en la orientación con sentido (S) o antisentido (AS), con indicación del número de nucleótidos G. Las barras rellenas indican las co-transfecciones con los 4 componentes del complejo de polimerasa del virus de la gripe A (PB2, PB1, PA y NP), las barras vacías indican las transfecciones de control en las cuales se omitió la construcción pHMG-NP.

Fig. 3. Análisis por FACS de células 293T transfectadas con 0,6 µg de minigenomas antisentido de la GFP con 2 residuos de G adicionales, 4 µg de construcciones de polimerasa del virus de la gripe A y 0,6 µg de o bien polimerasa de T7 de tipo natural (C) o bien una polimerasa de T7 que contiene una señal de localización nuclear (N), o ambas construcciones en una relación 1:1 (C/N). Panel izquierdo: % de células positivas a la GFP 30 horas después de la transfección. Panel derecho: nivel de expresión de la GFP (fluorescencia media) en la fracción positiva a la GFP.

Fig. 4. Análisis por FACS de células 293T o BSR-T7 transfectadas con 0,6 µg de la construcción que codifica el minigenoma antisentido de la GFP con 2 residuos de G adicionales y 4 µg de las construcciones de la polimerasa del virus de la gripe A. Se muestra el nivel de expresión de la GFP (fluorescencia media) en la fracción de células positivas a la GFP. Las células fueron transfectadas con y sin un plásmido que expresa la polimerasa de T7 que contiene una señal de localización nuclear (293T vs. 293T N o BSR-T7 vs. BSR-17 N). Las barras rellenas indican las co-transfecciones con los 4 componentes del complejo de polimerasa del virus de la gripe A (PB2, PB1, PA y NP), y las barras vacías indican las transfecciones de control en las cuales se omitió la construcción pHMG-NP.

Fig. 5. Análisis por FACS de células 293T transfectadas con 0,6 µg de construcciones que codifican el minigenoma antisentido de la GFP con 2 residuos de G adicionales (AS-2G) o el minigenoma con sentido de la GFP (S-0G) y 0,6 µg de un plásmido que expresa la polimerasa de T7 con una señal de localización nuclear y 4 µg de plásmidos que expresan los genes de la polimerasa del virus de la gripe A. Panel izquierdo: % de células positivas a la GFP 30 horas después de la transfección. Panel derecho: nivel de expresión de la GFP (fluorescencia media) en la fracción positiva a la GFP. Las barras rellenas indican las co-transfecciones con los 4 componentes del complejo de polimerasa del virus de la gripe A (PB2, PB1, PA y NP), y las barras vacías indican las transfecciones de control en las cuales se omitió la construcción pHMG-NP.

Fig. 6 Análisis por FACS de células 293T y células de MDCK transfectadas con 0,6 µg de construcciones que codifican el minigenoma antisentido de la GFP con 2 residuos de G adicionales (AS-2G), 0,6 µg de un plásmido que expresa la polimerasa de T7 con una señal de localización nuclear y 4 µg de plásmidos que expresan los genes de la polimerasa del virus de la gripe A. Panel izquierdo: % de células positivas a la GFP 30 horas después de la transfección. Panel derecho: nivel de expresión de la GFP (fluorescencia media) en la fracción positiva a la GFP. Las barras rellenas indican las co-transfecciones con los 4 componentes del complejo de polimerasa del virus de la gripe A (PB2, PB1, PA y NP), y las barras vacías indican las transfecciones de control en las cuales se omitió la construcción pHMG-NP.

Descripción detallada

Ejemplo 1

Generación de virus recombinante de la gripe A usando un sistema genético inverso basado en RNA-polimerasa de T7

Introducción

5 Durante mucho tiempo, la investigación fundamental de los virus de la gripe A ha estado impedida por la falta de disponibilidad de sistemas genéticos inversos eficientes. Aunque las técnicas genéticas inversas más antiguas para los virus de RNA de cadena negativa se desarrollaron de hecho para el virus de la gripe A (7, 18), sólo recientemente se consiguió la obtención de este virus exclusivamente a partir de DNA recombinante (9, 20).

El virus de la gripe A es un virus de RNA de cadena negativa. Durante el ciclo de replicación viral, se producen tres tipos de RNA: RNA viral genómico de sentido negativo (vRNA), RNA de sentido positivo complementario del RNA genómico (cRNA) y RNA mensajero con sentido positivo (mRNA). Mientras que el vRNA y el cRNA contienen esencialmente extremos no modificados, el mRNA está protegido en los extremos y tiene una cola de poli(A) (16).

10 La RNA-polimerasa I (Poll) es una enzima nucleolar que transcribe el RNA ribosómico (rRNA) y se expresa abundantemente en células en crecimiento. Al igual que el vRNA, el rRNA no tiene protección en los extremos ni cola de poli(A) (23). Hobom y sus colegas (19, 21, 29) produjeron exitosamente segmentos artificiales similares al vRNA del virus de la gripe con extremos precisos 5' y 3' usando Poll. La transcripción de cDNA clonado en el contexto de una casete promotor-terminador de Poll permitió la generación de moléculas similares al vRNA con extremos 5' y 3' correctos (29). Estudios posteriores que implicaron un virus de la gripe auxiliar demostraron que estas moléculas de vRNA genómico podían ser reconocidas y replicadas por el complejo de polimerasa del virus de la gripe y empaquetadas en los virus de la gripe de la progenie. Este sistema permitió la generación de virus de la gripe que contenían mutaciones en uno de los segmentos génicos virales o en un segmento génico adicional, permitiendo por tanto estudios de genes virales y sus productos. Como resultado del uso de virus auxiliares, se requirió la selección de virus transfectantes que era bastante engorroso.

25 Neumann et al., diseñaron un sistema de Poll para la recuperación de los virus de la gripe A a partir enteramente de cDNA clonado (20). Los cDNA que codifican los vRNA de longitud completa del virus de la gripe A fueron clonados entre el promotor de Poll humano y el terminador de Poll de ratón. En principio, la transfección de estos ocho plásmidos en células eucariotas debe dar como resultado la síntesis de los ocho vRNA de la gripe. Se co-transfectaron células de riñón embrionario humano (293T) con estos ocho plásmidos de expresión de vRNA y plásmidos que expresan la nucleoproteína viral y las proteínas polimerasas PB2, PB1 y PA a partir de un promotor de RNA-polimerasa II (PolII). Los vRNA sintetizados por la Poll celular fueron empaquetados en las RNP y se recuperaron cantidades mayores de 1×10^3 unidades formadoras de placas de virus infeccioso por ml (ufp/ml) de líquido sobrenadante. La co-transfección con plásmidos que expresan las proteínas estructurales virales restantes condujo a un aumento sustancial en la producción de virus, concretamente 3×10^4 a 5×10^7 ufp/ml (20). Fodor et al., describieron un sistema similar para la recuperación del virus de la gripe A (9). Este sistema dependía de ocho plásmidos que codifican los ocho cDNA del vRNA, flanqueados por un promotor Poll humano, pero que contenía una secuencia de ribozima del virus de la hepatitis δ (H δ Vrib) en lugar de una secuencia de terminador de Poll. Estos plásmidos se co-transfectaron en células Vero con cuatro plásmidos que expresaban las proteínas PB1, PB2, PA y NP a partir de un promotor tardío principal de adenovirus de tipo 2. Usando cantidades iguales de cada uno de los plásmidos de expresión, Fodor et al., describieron una tasa de obtención de 1 a 2 partículas infecciosas virales a partir de 10^6 células transfectadas (9). Los inventores hemos diseñado un sistema genético inverso similar para producir el virus recombinante de la gripe A/PR/8/34. Hemos llegado a la conclusión de que pueden obtenerse títulos de virus de $\sim 10^4$ sin replicación de virus en el cultivo de las células transfectadas que pueden ser aumentados hasta $>10^7$ cuando se deja que el virus se replique (4). Puesto que estos sistemas activados por Poll requerían la co-transfección de 12-16 plásmidos, era necesario el uso de líneas celulares que pudieran ser transfectadas con altas eficiencias para la producción eficiente de virus recombinante.

45 Posteriormente, Hoffmann et al., desarrollaron un sistema bidireccional de transcripción Poll-PolII para la generación de virus de la gripe A a partir solamente de ocho plásmidos (12). En este sistema bidireccional, se insertó el cDNA del vRNA entre el promotor de Poll humano y las secuencias mínimas del terminador de Poll de ratón. Este casete completo se insertó entre un promotor de PolII y un sitio de poliadenilación. Esto permitió la transcripción de vRNA y mRNA a partir de los promotores de Poll y PolII respectivamente, en una sola construcción. La co-transfección de ocho plásmidos Poll-PolII, cada uno codificando uno de los segmentos génicos del virus de la gripe A, en células 293T co-cultivadas con células de riñón canino Madin Darby (MDCK) dio como resultado la recuperación del virus de infeccioso la gripe A, con rendimientos de hasta 2×10^7 ufp/ml de líquido sobrenadante (12). El uso de un molde para la síntesis tanto de mRNA como de vRNA redujo el número de plásmidos requerido para la generación del virus. Se describió que la eficiencia de la generación de virus en este sistema era similar a la del sistema unidireccional de Poll (12-16 plásmidos).

55 Aunque los promotores de PolII son frecuentemente compatibles con la maquinaria de transcripción de especies diferentes, la transcripción de los promotores de Poll exhibe especificidad de especies rigurosa, aunque no absoluta. Esta especificidad de especies es conferida por la interacción de los factores de transcripción con el promotor y, en menor extensión, por las interacciones proteína-proteína entre estos factores (23).

60 La especificidad de especies de los sistemas genéticos inversos basados en Poll constituye una desventaja importante. Los sistemas genéticos inversos descritos anteriormente empleaban un promotor de Poll humano, que limita la producción de virus recombinantes a células de origen primate, tal como células 293T o células Vero.

Aunque los promotores de Poll han sido caracterizados para varias especies incluyendo seres humanos, ratón, rata y cerdo (8, 14, 17), permanecen desconocidos para muchas otras. Las células caninas y aviares se usan habitualmente para investigación del virus de la gripe A y la producción de vacunas, pero todavía no se han descrito los promotores de Poll canino y aviar. Para mejorar la flexibilidad de la tecnología genética inversa del virus de la gripe, los inventores buscamos desarrollar un sistema genético inverso universal. Hemos elegido diseñar un sistema basado en la expresión de los segmentos génicos del virus de la gripe A bajo el control del promotor de la RNA-polimerasa de T7 (abreviadamente en lo sucesivo pT7). Debido a que la RNA-polimerasa del bacteriófago T7 (abreviadamente en los sucesivos T7pol) puede ser suministrada a células por transfección o a través del uso de líneas celulares establemente modificadas, este sistema no está restringido a células de una especie particular.

Los sistemas genéticos inversos basados en T7pol se usan para la obtención de virus de cadena negativa no segmentados. Schnell et al., fueron los primeros en obtener un virus de cadena negativa no segmentado a partir de solamente cDNA clonado (27). Se preparó un clon de cDNA que codificaba el RNA anti-genómico de longitud completa del virus de la rabia (RV). Este cDNA estaba flanqueado por pT7 y una secuencia de H \bar{O} Vrib próxima a una secuencia terminadora de T7pol (tT7). Después de la transcripción por T7pol, se generó un extremo 3' preciso del genoma por escisión autocatalítica de la secuencia de H \bar{O} Vrib en el extremo 3'. Este plásmido se co-transfectó con plásmidos de expresión que codificaban la proteína N viral y las proteínas polimerasas L y P bajo el control de pT7 en células que expresaban la T7pol. Este método condujo a la obtención de RV recombinante, pero solamente a partir de aproximadamente 1 de 2 x 10⁷ células transfectadas (27). Desde entonces, se han descrito sistemas similares para las familias *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Filoviridae* de virus de cadena negativa (abreviadamente NSV por la expresión inglesa *Negative Strand Virus*) (10).

Para la obtención con éxito de los virus de cadena negativa no segmentados a partir de cDNA, se produce RNA (cRNA) antígenómico muy frecuentemente de sentido positivo en lugar de vRNA de sentido negativo. Se cree que la presencia simultánea de vRNA de sentido negativo sin envoltorio y mRNA de sentido positivo que codifica las proteínas virales dará como resultado la hibridación, impidiendo el ensamblaje del genoma en los complejos ribonucleoproteicos (RNP) (27). Los virus de cadena negativa no tienen normalmente este problema puesto que siempre mantienen su genoma en la forma de RNP, lo que impide la hibridación. La recuperación del virus Sendai (15), el virus de la parainfluenza humana de tipo 3 (6) y el metaneumovirus humano (11) ha sido descrita con cDNA que codifica RNA genómico de sentido negativo; sin embargo, las eficiencias fueron significativamente menores que los resultados con el RNA de sentido positivo. Este principio se ha aplicado también a la obtención del virus recombinante de la gripe. Hoffmann et al., (13) determinaron también la eficiencia de la producción de virus recombinante de la gripe a partir de RNA antígenómico de sentido positivo. En contraste con los virus de cadena negativa no segmentados y segmentados que se replican solamente en el citoplasma, el virus de la gripe A no pudo ser obtenido de ambos vectores genómicos y antígenómicos con eficiencias similares.

Un factor limitante en los sistemas de obtención del virus que usan pT7 es que los residuos en las posiciones +1 a +3 pueden afectar a la transcripción. Se observó que la transcripción de un cDNA puede ser aumentada por la introducción de 2 o 3 residuos de G directamente en una posición situada hacia el extremo 3' (aguas abajo) de pT7 (22). Esta observación se ha aplicado a la obtención de, por ejemplo, RV recombinante (27), virus de la estomatitis vesicular (28), virus sincitial respiratorio (3) y metaneumovirus humano (11). Aparentemente, para estos virus, los residuos de G adicionales en uno de los extremos genómicos no afectaban a la replicación del virus, pero tenían un efecto positivo sobre la transcripción activada por T7pol.

Los sistemas basados en T7pol se han usado extensivamente para estudios genéticos inversos del virus de la gripe (18), pero la producción basada en plásmidos de virus recombinante de la gripe no ha sido descrita hasta la fecha. En la presente invención los inventores describimos uno de dichos sistemas genéticos inversos basados en T7pol para la producción por primera vez de virus recombinante de la gripe.

Materiales y métodos

Células y virus

Se cultivaron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en EMEM (BioWhittaker) suplementado con FCS al 10%, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM, 1,5 mg/ml de bicarbonato de sodio, Hepes 10 mM y aminoácidos no esenciales. Se cultivaron células 293T en DMEM (BioWhittaker) suplementado con FCS al 10%, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales. Las células BSR-T7 son una línea celular de riñón de crías de hámster que expresa establemente RNA-polimerasa de T7 (2). Se cultivaron células BSR-T7 en DMEM suplementado con FCS al 10 %, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 0,5 mg/ml de G418 (Life Technologies, Breda, Holanda). El virus de la gripe A/PR/8/34 que está adaptado para replicación en huevos de pollo embrionados y no puede replicarse óptimamente en cultivos de células de mamíferos se sometió a pases siete veces, a una baja multiplicidad de infección, en células de MDCK cultivadas en medio Episerf (Gibco BRL) suplementado con 10 UI/ml de penicilina y 10 μ g/ml de estreptomycin. Después del séptimo pase, se obtuvieron habitualmente títulos de virus de 10⁸ dosis que infectan al 50% de las células cultivadas en tejidos por mililitro (abreviadamente TCID₅₀/ml por la expresión *Tissue Culture Infections Dose/ml*).

Transfección de células 293T

Se realizaron transfecciones transitorias mediadas por fosfato de calcio de células 293T esencialmente como se describe en la referencia (24). Las células fueron cultivadas el día antes de la transfección en placas de cultivo gelatinizadas de 100 mm de diámetro hasta obtener monocapas confluentes al 50 por ciento. Después de transfección durante una noche el medio de transfección fue reemplazado por medio de nueva aportación suplementado con FCS al 2% para la producción de virus o FCS al 10% para todas las otras transfecciones. Las células se incubaron durante 30 a 72 horas, tras lo cual se recogieron los líquidos sobrenadantes y se analizaron las células por fluorescencia, si era apropiado. El plásmido pEGFP-N1 (Clontech, BD Biosciences, Amsterdam, Holanda) fue transfectado en paralelo en todos los experimentos y se midió el porcentaje de células fluorescentes en un citómetro de flujo *FACSCalibur* (Becton Dickinson), confirmando que la eficiencia de la transfección variaba de 95 a 100 por ciento. Los líquidos sobrenadantes que contenían virus se clarificaron por centrifugación durante 10 minutos a 300 x g. Los títulos de virus en el líquido sobrenadante se determinaron bien directamente o bien por conservación a 4°C durante menos de una semana, o a -80°C durante más de una semana.

Transfección de células de MDCK

La transfección transitoria de células de MDCK se realizó esencialmente como se describió previamente (1). En resumen, 240 µl de medio Optimem I (GibcoBRL) se añadieron a 10 µl de Lipofectamina 2000 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A esta mezcla se añadió la cantidad destinada de DNA, ajustada a un volumen de 50 µl usando medio Optimem I. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la incubación, se añadieron 200 µl de medio de cultivo de células MDCK (véase antes) sin penicilina ni estreptomycin y esta mezcla se añadió a 1×10^6 células de MDCK en suspensión en una placa de 6 pocillos. Después de una incubación de 5 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo de células de MDCK sin penicilina ni estreptomycin. Este medio se reemplazó por medio de cultivo de células de MDCK que contenía FCS al 2% después de incubación durante la noche.

Transfección de células BSR-T7.

Para la transfección transitoria de células BSR-T7, se cultivaron 400.000 células en placas de cultivo de 6 pocillos un día antes de la transfección para obtener monocapas confluentes al 50-70%. Se añadió DMEM exento de suero (240 µl) a 10 µl de Lipofectamina 2000 y se incubó durante 4 minutos a temperatura ambiente. A esta mezcla se añadió DNA ajustado a 50 µl con DMEM exento de suero y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Antes de la transfección, el medio se reemplazó con 2 ml de DMEM exento de suero. Después de la incubación, la mezcla de transfección se añadió gota a gota a las células y se incubó durante 5 horas a 37°C. Después de la transfección, las células se lavaron con PBS una vez y se añadieron 2 ml de DMEM suplementado con FCS al 2% para la producción de virus o con FCS al 10% para análisis por FACS.

Plásmidos

Se usaron los vectores de expresión eucariotas que codifican T7pol (pAR3126 y pAR3132). Mientras el plásmido pAR3126 codifica una T7pol de tipo natural, el plásmido pAR3132 expresa una T7pol que contiene una señal de localización nuclear (abreviadamente NLS por la expresión inglesa *Nuclear Localization Signal*), que dirige eficazmente la T7pol al núcleo celular (5). Los plásmidos de expresión eucariotas a partir de los cuales se expresan las proteínas polimerasas del virus de la gripe A emplean un promotor de hidroximetil-glutaril-coenzima A-reductasa, pHMG-PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA y pHMG-NP (25).

La H δ Vrib de pPoll-CAT-RT (25) se amplificó por PCR y se clonó en los sitios XbaI-BamHI de pSP72. Una secuencia de tT7, digerida con BamHI-EcoRV, se clonó en los sitios BamHIHpaI de pSP72-H δ Vrib, dando como resultado pSP72-H δ Vrib-tT7 (MS24). Un oligonucleótido que codifica el pT7 se ligó en los sitios NdeI-XbaI de pSP72-H δ Vrib-tT7 en el contexto apropiado para los sitios BbsI introducidos, dando como resultado el vector pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7 (MS25, Fig. 1). Un marco de lectura abierto de la proteína fluorescente verde (GFP) flanqueado por las NCR del segmento 5 del virus de la gripe A/PR/8/34 se clonó en los sitios BbsI de pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7, usando pSP-Hu-GFP-Mu (4) como molde. Este minigenoma de la GFP se clonó tanto en la orientación con sentido como en la orientación antisentido, y contenía 0/2/3 residuos de G adicionales directamente en una posición en la dirección del extremo 3' (aguas abajo) de pT7 (Fig. 1).

Para clonar los segmentos génicos del virus de la gripe A/PR/8/34 en pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7, se usaron las construcciones bidireccionales del virus de la gripe A/PR/8/34 descritas por de Wit et al., (4) como molde para la PCR (el cuarto nucleótido desde 3' estaba en correspondencia con las secuencias del virus de la gripe A/PR/8/34 descritas en la *National Influenza Sequence Database*). Se usaron cebadores que contenían un sitio de restricción AarI para clonar los segmentos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y se usó el ligamiento de los extremos romos para el segmento 5; los segmentos génicos fueron clonados en los sitios BbsI en una orientación antisentido que contenía 2 residuos de G adicionales después del pT7.

Se produjo un vector bidireccional pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7-pCMV (MS65, Fig. 1) clonando un promotor del CMV (pCMV) en una posición en la dirección del extremo 3' (aguas abajo) de tT7 para permitir la producción de mRNA a partir de los correspondientes segmentos génicos. El pCMV fue amplificado por PCR usando cebadores que

contenían sitios de restricción AseI. El pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7 se digirió parcialmente con AseI y pCMV se ligó en una posición en la dirección del extremo 3' (aguas abajo) desde el tT7 en la dirección apropiada para la producción de mRNA del segmento génico.

5 De nuevo se clonaron segmentos del virus de la gripe A/PR/8/34 para obtener cada una de las construcciones bidireccionales del virus de la gripe A/PR/8/34 activadas por T7pol.

Los inventores también generamos un conjunto de vectores bidireccionales en los cuales estaba suprimido el tT7. Esto se hizo digiriendo pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7-pCMV con BamHI-BpeEI, tratando con la enzima de Klenow, y religando para generar pSP72-pT7-H δ Vrib-pCMV (MS90, Fig. 1). De nuevo se clonaron los segmentos del virus de la gripe A/PR/8/34 para obtener cada una de las construcciones bidireccionales del virus de la gripe A/PR/8/34 activadas por T7pol.

Todos los plásmidos fueron secuenciados usando un kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) y un *3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Producción de virus recombinante con el sistema basado en T7pol.

15 Se transfectaron células 293T, como se ha descrito antes, con 5 μ g de cada uno de los plásmidos unidireccionales que contenía un segmento génico de PR/8/34, 5 μ g de cada uno de los plásmidos de expresión HMG-PB2, HMG-PB1, HMG-PA, HMG-NP y 15 μ g de pAR3132. Alternativamente, los inventores transfectamos 5 μ g de cada uno de los plásmidos bidireccionales que contenían un segmento génico de PR/8/34 y 15 μ g de pAR3132. Se recogieron los líquidos sobrenadantes 72 horas después de la transfección y se usó 1 ml para infectar una monocapa confluyente de células de MDCK.

20 Infecciones y titulaciones del virus

Antes de la inoculación, las células de MDCK se lavaron dos veces con PBS y se usó 1 ml de líquido sobrenadante del cultivo de células 293T para inocular una monocapa confluyente de células de MDCK en una placa de 6 pocillos; durante la infección se añadieron 40 μ g of tripsina (2,5%, Bio Whittaker). Las placas se conservaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron dos veces con PBS, tras lo cual se añadieron 2 ml de EMEM (BioWhittaker) suplementado con BSA al 4%, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, glutamina 2 mM, 1,5 mg/ml de bicarbonato de sodio, Hepes 10 mM, aminoácidos no esenciales y 20 μ g/ml de tripsina (medio de infección). 3 días después de la infección, se recogieron los líquidos sobrenadantes de los cultivos y se analizó su actividad de HA como un indicador de la infección de las células. Las titulaciones de los virus se realizaron como se ha descrito previamente (26). En resumen, se prepararon series de diluciones 1:10 de los líquidos sobrenadantes de las células transfectadas en el medio de infección. Antes de la inoculación, las células se lavaron dos veces con PBS. 100 μ l de los líquidos sobrenadantes de cultivo diluidos se usaron para inocular una monocapa confluyente de células de MDCK en placas de 96 pocillos. Después de 1 hora a 37°C, las células se lavaron de nuevo con PBS y se añadieron a cada pocillo 200 μ l de medio de infección de nueva aportación. 3 días después de la infección, se analizó la actividad HA de los líquidos sobrenadantes de los cultivos como un indicador de la infección de las células en los pocillos individuales. Los títulos infecciosos se calcularon a partir de 10 duplicados de acuerdo con el método de Spearman-Kärber (26).

Resultados

Ensayos de los minigenomas de la GFP con un sistema genético inverso unidireccional basado en T7pol

40 Se construyó un vector unidireccional que contenía pT7, H δ Vrib y tT7. Un marco de lectura abierto de la GFP flanqueado por las regiones no codificadoras (NCR) del segmento 5 del virus de la gripe A/PR/8/34 se clonó en pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7 en la orientación con sentido (S) y en la orientación antisentido (AS) con 0, 2 o 3 residuos de G adicionales (Fig. 1 y apéndices 2 y 3). Estas construcciones se denominaron S-0G, S-2G, S-3G, AS-0G, AS-2G y AS-3G respectivamente. Los inventores analizamos cuál de estas opciones dio como resultado la mejor prestación.

Los inventores transfectamos células 293T con uno de los minigenomas de la GFP (S-0G, S-2G, S-3G, AS-0G, AS-2G, AS-3G), un plásmido de expresión de T7pol (pAR3132) y cuatro plásmidos que expresan las proteínas PB2, PB1, PA y NP (pHMG-PB2, pHMG-PB1, pHMG-PA, pHMG-NP). Como controles, realizamos las mismas transfecciones en las cuales se omitió la pHMG-NP, que debía dar como resultado la falta de replicación del minigenoma de la GFP. 30 horas después de la transfección, las células se analizaron para determinar la fluorescencia en un aparato *FACS Calibur*. Los resultados se representan en la Fig. 2. En el panel izquierdo se puede ver que se observó la proporción más alta de células GFP positivas por transfección del minigenoma de la GFP en la orientación antisentido, con dos residuos de G adicionales.

55 Las otras construcciones del minigenoma de la GFP también dieron una proporción de células GFP positivas, pero algo más pequeña. Cuando se comparó la fluorescencia media de las células GFP positivas (Fig. 2, panel derecho), de nuevo el minigenoma de la GFP en la orientación antisentido con dos residuos de G adicionales presentó la mejor prestación. En este experimento, el minigenoma de la GFP en la orientación con sentido con dos residuos de G adicionales presentó la peor prestación y las otras construcciones fueron intermedias.

Aunque los inventores observamos alguna variación con respecto a la proporción de células que expresan la GFP y niveles de expresión de la GFP entre los diferentes plásmidos del minigenoma de la GFP de un experimento a otro (no se muestran los datos), en general se comportó mejor el minigenoma de la GFP en la orientación antisentido con dos residuos de G adicionales, y por tanto esta construcción fue seleccionada para los experimentos subsiguientes.

5 Expresión nuclear frente a citoplásmica de T7pol.

Un problema que los inventores teníamos potencialmente que resolver fue la expresión de T7pol. Para sistemas genéticos inversos de paramixovirus se usa una T7pol expresada primariamente en el citoplasma celular que es deseable puesto que la replicación de los paramixovirus también tiene lugar en el citoplasma. Los virus de la gripe se replican en el núcleo celular y por tanto no puede ser la mejor opción la expresión de T7pol en el citoplasma. Por tanto, los inventores deseábamos comparar el nivel de expresión de la GFP cuando se usó bien un versión citoplásmica de T7pol (plásmido AR3126) o bien T7pol que contenía una señal de localización nuclear (NLS, plásmido pAR3132).

Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 3. Cuando se usó un plásmido de expresión de T7pol de tipo natural, la fluorescencia media de la GFP en las células positivas fue 521. El nivel de expresión de la GFP pudo ser potenciado significativamente usando una T7pol que contenía una señal de localización nuclear (fluorescencia media 1106). Cuando se combinaron ambas construcciones de T7pol, con y sin señal de localización nuclear (relación 1:1, manteniendo inalterada la cantidad total de plásmido transfectado), se observó un nivel intermedio de expresión de la GFP (fluorescencia media 775). En numerosos experimentos independientes, que usan una amplia variedad de plásmidos con minigenoma de la GFP estos resultados fueron reproducibles; se observó un aumento de 2 a 10 veces en la expresión de la GFP cuando se usó una versión nuclear de la T7pol (datos no mostrados). Por tanto, en experimentos subsiguientes, los inventores hicimos uso de la T7pol que contenía una señal de localización nuclear.

Expresión transitoria frente a estable de T7pol

Para varios sistemas genéticos inversos de paramixovirus, la T7pol no es suministrada por transfección de plásmidos sino a través del uso de una línea celular que permite la expresión estable de T7pol. Para este fin están disponibles células de riñón de crías de hámster (BSR-T7). Los inventores analizamos si las células BSR-T7 podrían ser usadas para la transcripción del minigenoma de la GFP del virus de la gripe que pudiera subsiguientemente replicarse por el complejo de polimerasa del virus de la gripe dando como resultado la expresión de la GFP (Fig. 4).

Como puede verse en la Figura 4, la elevada fluorescencia de la GFP en células 293T depende fuertemente de la expresión de la T7pol. En células BSR-T7, se observaron niveles relativamente altos de expresión de la GFP por co-transfección del minigenoma de la GFP con el complejo de polimerasa del virus de la gripe, en contraste con las transfecciones en las cuales se omitió el plásmido pHMG-NP. Por la adición de un plásmido que expresa una versión nuclear de T7pol, se encontró que la expresión de la GFP era incluso más elevada. Los niveles relativamente altos de expresión de la GFP en células BSR-T7 sugieren que la expresión estable de la T7pol es más eficiente que la expresión transitoria por transfección. Sin embargo, el experimento en el cual la T7pol nuclear fue proporcionada por transfección sugiere que para el sistema genético inverso del virus de la gripe, sería incluso más eficiente una línea celular estable que expresara una T7pol nuclear en lugar de T7pol de tipo natural.

Producción de virus recombinante con un sistema genético inverso unidireccional basado en T7pol.

A continuación, los segmentos génicos del virus de la gripe A/PR/8/34 se clonaron en el vector pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7 para la generación del virus recombinante de la gripe A/PR/8/34.

Los inventores transfectamos células 293T con las ocho construcciones que codifican los segmentos génicos de los virus de la gripe A/PR/8/34, pT7pol (pAR3132), pHMG-PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA y pHMG-NP. Después de la transfección, se añadió tripsina al medio para permitir la replicación de los virus producidos. 72 horas después de la transfección, se recogieron los líquidos sobrenadantes y se usaron para inocular células de MDCK. 3 días después de la inoculación, se realizó un ensayo de HA en el líquido sobrenadante de estas células de MDCK como indicación de la replicación del virus. El ensayo de HA fue positivo. Subsiguientemente, se determinó el título del virus del líquido sobrenadante de las células 293T y de MDCK. El título del virus en el líquido sobrenadante de las células 293T mostró que era $1,6 \times 10^1$ TCID₅₀/ml; el título del virus en el líquido sobrenadante de las células de MDCK mostró que era $2,0 \times 10^7$ TCID₅₀/ml. Se obtuvieron títulos de virus algo más bajos en las células 293T y las células de MDCK cuando no se añadió tripsina a las células 293T después de la transfección (no se muestran los datos). Por tanto esto representa la primera obtención del virus recombinante de la gripe A solamente de plásmidos que no empleó un promotor de Poll.

Un sistema bidireccional de T7

A continuación los inventores deseábamos desarrollar un sistema genético inverso bidireccional bajo el control del pT7. Se produjo un vector plasmídico clonando pCMV en pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7, dando como resultado el vector pSP72-pT7-H δ Vrib-tT7-pCMV (Fig. 1). Un marco de lectura abierto de la GFP flanqueado por regiones no codificadoras (abreviadamente NCR por la expresión inglesa *Non-Coding Regions*) del segmento 5 del virus de la

gripe A/PR/8/34 se clonó en pSP72-pT7-HδVrib-tT7-pCMV en orientación antisentido con 2 residuos de G adicionales. Debido a que los inventores habíamos anticipado que este plásmido daría lugar a la expresión de la GFP sin necesidad de replicación del minigenoma por el complejo de polimerasa del virus de la gripe (pCMV) está en la orientación con sentido con respecto al minigenoma), también hicimos una construcción similar que contenía el minigenoma (0 residuos de G) en la orientación con sentido con respecto a pT7 (por tanto antisentido con respecto al pCMV). Los plásmidos con el minigenoma se transfectaron en células 293T junto con plásmidos que expresaban la T7pol nuclear y pHMGPB1, pHMG-PB2, pHMG-PA y pHMG-NP. Las células fueron analizadas por FACS después de 30 horas (Fig. 5).

La transfección del minigenoma de la GFP con sentido (S-0G) con un complejo incompleto de polimerasa del virus de la gripe dio como resultado muy pocas células GFP positivas (Fig. 5, panel izquierdo) con muy baja expresión de la GFP (Fig. 5, panel derecho). En presencia del complejo completo de polimerasa del virus de la gripe, ~7 % de las células eran GFP positivas con una fluorescencia media de ~1200. Usando el plásmido con el minigenoma de la GFP antisentido, una proporción relativamente grande de las células (~10 %) expresó la GFP en ausencia un complejo completo de polimerasa del virus de la gripe, pero solamente a bajos niveles (fluorescencia media de la GFP 182). Por co-transfección del complejo completo de polimerasa del virus de la gripe, no aumentaba la proporción de células que expresan la GFP, mientras que el nivel de expresión de la GFP por célula aumentó significativamente (fluorescencia media de la GFP 1205). Por tanto, de este experimento los inventores sacamos la conclusión de que el vector de expresión bidireccional era funcional; los inventores observamos bajos niveles de expresión de la GFP sin necesidad del complejo de polimerasa del virus de la gripe, como resultado de la producción mRNA de la GFP a partir del pCMV. Hay que advertir que esto fue confirmado por transfección de células 293T con el plásmido con el minigenoma de la GFP AS-2G solo, dando como resultado niveles similares de expresión de la GFP (expresándose ~19 % de las células a una fluorescencia media de 128 datos no mostrados). Además, los inventores observamos mayores niveles de expresión de la GFP en presencia del complejo de polimerasa del virus de la gripe como resultado de la replicación del minigenoma transcrito a partir pT7. Por tanto, era funcional el plásmido de expresión pT7-pCMV bidireccional.

Producción de virus recombinante con un sistema genético inverso bidireccional basado en T7pol

A continuación, los segmentos génicos del virus de la gripe A/PR/8/34 se clonaron en el vector pSP72-pT7-HδVrib-tT7-pCMV para la generación del virus recombinante de la gripe A/PR/8/34.

Los inventores transfectamos células 293T con las ocho construcciones que codifican los segmentos génicos del virus de la gripe A/PR/8/34 y pT7pol (pAR3132). Después de la transfección, se añadió tripsina al medio para permitir la replicación de los virus producidos. 72 horas después de la transfección, se recogieron los líquidos sobrenadantes y se usaron para inocular células de MDCK. 3 días después de la inoculación, se realizó un ensayo de HA del líquido sobrenadante de estas células de MDCK como indicación de la replicación del virus. El ensayo de HA fue negativo lo que indica que no se recuperó virus recombinante.

A partir de ensayos informadores de minigenomas usando los vectores bidireccionales para expresar los genes PB2, PB1, PA y NP, los inventores obtuvimos pruebas de que la expresión de proteínas en estos plásmidos era muy baja (los datos no se muestran). Emitimos la hipótesis de que la secuencia de tT7 estaba interfiriendo con la forma de transcripción del pCMV, dando como resultado baja producción de los genes codificados. Por tanto generamos un nuevo plásmido bidireccional, a partir del cual se eliminó la secuencia de tT7 (pSP72-pT7-HδVrib-pCMV). Los segmentos génicos del virus de la gripe A/PR/8/34 se clonaron en el vector pSP72-pT7-HδVrib-pCMV para la generación del virus recombinante de la gripe A/PR/8/34. En los intentos iniciales, de nuevo no se produjo virus recombinante. Sin embargo, por una optimización de la cantidad de plásmidos usados para la transfección produjimos exitosamente virus recombinante. Las cantidades de plásmidos usadas para este experimento fueron 10 µg de cada una de las construcciones que codifican PB2, PB1, PA y HA, y 5 µg de cada una de las construcciones que codifican NP, NA, MA, y NS. Aunque los títulos de virus recombinantes en las células 293T fueron indetectables, la inoculación subsiguiente de células de MDCK dio como resultado un virus con un título inicial de $1,3 \times 10^5$ TCID50/ml.

El sistema T7pol en células de MDCK

Para obtener más pruebas de la naturaleza universal de los sistemas genéticos inversos basados en T7pol, los inventores analizamos la replicación del minigenoma de la GFP en células de MDCK en lugar de en células 293T. Aunque los experimentos con células de BSR-T7 ya proporcionaron pruebas de que el sistema genético inverso de T7pol funciona en células de origen no primate (Fig. 4), las células de MDCK se usan más ampliamente para investigación del virus de la gripe y la producción de vacunas.

Como puede verse en la Fig. 6, se encontró que el sistema genético inverso basado en T7pol era funcional en células de MDCK. Combinados con los resultados en células BSR-T7 (Fig. 4), estos experimentos indican que el sistema genético inverso de T7pol representa realmente un sistema "universal", aplicable a una amplia variedad de tipos de células. A partir de este experimento, también se puede sacar la conclusión de que ahora es posible la producción de virus recombinantes de la gripe a partir de células que no son de primates.

5 En la presente descripción los inventores hemos mostrado, por primera vez, la producción del virus recombinante de la gripe A A/PR/8/34 (cepa NIBSC adaptada a células de MDCK) usando un sistema basado en T7pol en células 293T. Sin embargo, no hay suposiciones que limiten el uso de estos métodos al virus de la gripe A A/PR/8/34; dichos métodos pueden ser aplicados a todos de virus de la gripe de los tipos A, B y C, así como a otros virus de RNA de cadena negativa segmentados. Hay también suposiciones que limitan el uso de estos métodos a las células 293T, las células BSR-T7 y las células de MDCK; la T7pol puede ser suministrada por ejemplo, por transfección de una amplia gama de líneas celulares en las cuales podrían entonces producirse virus recombinantes.

10 Hay también una flexibilidad significativa con respecto a los vectores plasmídicos para esta tecnología genética inversa basada en T7pol, y los elementos que contienen. En la presente invención, usamos la RNA-polimerasa del bacteriófago T7 para producir moléculas de vRNA o de RNA similares a cRNA, pero también podrían usarse otras
15 diversas RNA-polimerasas, tales como la RNA-polimerasa del bacteriófago SP6. En los experimentos mostrados en la presente invención, la RNA-polimerasa de T7 fue modificada para contener la señal de localización nuclear del antígeno T grande del SV40, pero las RNA-polimerasas pueden ser modificadas usando una variedad de otras señales de dirección a dianas nucleares (por ejemplo, las de la proteína K de la hnRNP). Los inventores usamos en esta descripción la secuencia de ribozima del virus delta de la hepatitis, pero podrían usarse alternativamente otras
20 secuencias de ribozima que han sido descritas. Finalmente, el sistema descrito en la presente memoria no depende del uso de vectores de expresión de la proteína polimerasa del virus de la gripe basados en el promotor de hidroximetil-glutaril-coenzima A-reductasa (construcciones de pHMG); podrían usarse proteínas polimerasa de una amplia gama de virus de la gripe y ser expresadas empleando una amplia gama de vectores de expresión.

20

Referencias

1. Basler, C. F., X. Wang, E. Muhlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klenk, A. Garcia-Sastre, and P. Palese. 2000. *The Ebola virus VP35 protein functions as a type 1 IFN antagonist*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:12289-94.
- 5 2. Buchholz, U. J., S. Finke, and K. K. Conzelmann. 1999. *Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter*. *J. Virol.*, 73:251-9.
3. Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock, and B. R. Murphy. 1995. *Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11563-7.
- 10 4. de Wit, E., M. 1. Spronken, T. M. Bestebroer, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. *Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments*. *Virus Res.*, 103:155-61.
- 15 5. Dunn, J. J., B. Krippel, K. E. Bernstein, H. Westphal, and F. W. Studier. 1988. *Targeting bacteriophage T7 RNA polymerase to the mammalian cell nucleus*. *Gene*, 68:259-266.
6. Durbin, A. P., S. L. Hall, J. W. Siew, S. S. Whitehead, P. L. Collins, and B. R. Murphy. 1997. *Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA*. *Virology*, 235:323-32.
7. Enami, M., W. Luytjes, M. Krystal, and P. Palese. 1990. *Introduction of sitespecific mutations into the genome of influenza virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3802-5.
- 20 8. Financsek, 1., K. Mizumoto, Y. Mishima, and M. Muramatsu. 1982. *Human ribosomal RNA gene: nucleotide sequence of the transcription initiation region and comparison of three mammalian genes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3092-6.
9. Fodor, E., L. Devenish, O. G. Engelhardt, P. Palese, G. G. Brownlee, and A. Garcia-Sastre. 1999. *Rescue of influenza A virus from recombinant DNA*. *J. Virol.* 73:9679-9682.
- 25 10. Garcia-Sastre, A. 1998. *Negative-strand RNA viruses: applications to bio-technology*. *Trends Biotechnol.*, 16:230-5.
11. Herfst, S., M. de Graaf, J. H. Schickli, R. S. Tang, J. Kaur, C. F. Yang, R. R. Spaete, A. A. Hallar, B. G. van den Hoogen, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. *Recovery of human metapneumovirus genetic lineages a and B from cloned cDNA*. *J. Virol.*, 78:8264-70.
- 30 12. Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster. 2000. *A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6108-13.
13. Hoffmann, E., and R. G. Webster. 2000. *Unidirectional RNA polymerase 1-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids*. *J. Gen. Virol.*, 81:2843-7.
- 35 14. Ishikawa, Y., G. Safrany, K. Hisatake, N. Tanaka, Y. Maeda, H. Kato, R. Kominami, and M. Muramatsu. 1991. *Structure of the core promoter of human and mouse ribosomal RNA gene. Asymmetry of species-specific transcription*. *J. Mol. Biol.*, 218:55-67.
15. Kato, A., Y. Sakai, T. Shioda, T. Kondo, M. Nakanishi, and Y. Nagai. 1996. *Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense*. *Genes Cells*, 1:569-79.
- 40 16. Lamb, R. A., and R. M. Krug. 1996. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*, p. 1353-1395. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
17. Ling, X., and N. Arnheim. 1994. *Cloning and identification of the pig ribosomal gene promoter*. *Gene*, 150:375-9.
18. Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Pavin, and P. Palese. 1989. *Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus*. *Cell*, 59:1107-13.
- 45 19. Neumann, G., and G. Hobom. 1995. *Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo*. *J. Gen. Virol.*, 76:1709-17.
20. Neumann, G., T. Watanabe, H. Ito, S. Watanabe, H. Goto, P. Gao, M. Hughes, D. R. Perez, R. Donis, E. Hoffman, G. Hobom, and Y. Kawaoka. 1999. *Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9345-9350.
- 50

21. Neumann, G., A. Zobel, and G. Hobom. 1994. *RNA polymerase 1-mediated expression of influenza viral RNA molecules*. *Virology*, 202:477-9.
22. Pattnaik, A. K., L. A. Ball, A. W. LeGrone, and G. W. Wertz. 1992. *Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone*. *Cell*, 69:1011-20.
- 5 23. Paule, M. R., and R. J. White. 2000. *Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III*. *Nucleic Acids Res.*, 28:1283-98.
24. Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1993. *Production of high-titre helper-free retroviruses by transient transfection*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8392-6.
- 10 25. Pleschka, S., R. Jaskunas, O. G. Engelhardt, T. Zurcher, P. Palese, and A. Garcia-Sastre. 1996. *A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus*. *J. Virol.*, 70:4188-92.
26. Rimmelzwaan, G. F., M. Baars, E. C. Claas, and A. D. Osterhaus. 1998. *Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro*. *J. Virol. Methods*, 74:57-66.
- 15 27. Schnell, M. J., T. Mebatsion, and K. K. Conzelmann. 1994. *Infectious rabies viruses from cloned cDNA*. *EMBO J.*, 13:4195-203.
28. Whelan, S. P., L. A. Ball, J. N. Barr, and G. T. Wertz. 1995. *Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92:8388-92.
29. Zobel, A., G. Neumann, and G. Hobom. 1993. *RNA polymerase I catalysed transcription of insert viral cDNA*. *Nucleic Acids Res.*, 21:3607-14.

20 Ejemplo 2

El virus recombinante se produce como antes, basándose en la cadena principal de virus de alta productividad (por ejemplo, los derivados de la cepa vacunal A/PR/8/34) con los genes HA y NA de un virus epidémico relevante (por ejemplo, A/Moscú/10/99). Después de la producción del virus recombinante por transfección, el virus se multiplica en el sustrato celular apropiado (por ejemplo, huevos, células de MDCK, células Vero) para disponer de cantidades suficientemente altas. Por propagación en huevos de pollo embrionados, se clarifica el líquido alantoideo por centrifugación durante 10 minutos a 1000 x g y filtración por un filtro de 0,45 micrómetros. El virus se sedimenta a continuación por centrifugación durante 1,5 horas a 150.000 x g a 4°C y se vuelve a poner en suspensión en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El virus se trata subsiguientemente con decanoil-N-metilglucamida al 2% (MEGA), se carga en una capa de sacarosa al 25% en PBS y se centrifuga durante 1,5 horas a 250.000 x g a 4°C.

La capa superior que contiene las proteínas HA y NA se dializa luego contra PBS y se confirman luego la pureza y cantidad de la preparación proteínica usando geles de SDS al 12,5%-poliacrilamida teñidos con azul brillante de Coomassie. Se inmunizan intramuscularmente hurones con ~10 microgramos de proteínas HA/NA. Si se desea, las vacunaciones se pueden realizar usando múltiples dosis subsiguientes o usando adyuvantes (MF59, ISCOM). Se determinan los títulos de anticuerpos de HA y NA en muestras de suero recogidas antes y después de la vacunación usando ensayos de inhibición de la hemaglutinación, ensayos de inhibición de neuraminidasa, ELISA, ensayos de neutralización del virus, etc. Los animales vacunados y los de control se inoculan 6 semanas después de la vacunación usando 1×10^5 dosis infecciosas del 50 por ciento del cultivo de tejidos (TCID₅₀) de virus de la gripe A/Moscú/10/99 o un material aislado de virus heterólogo. Tras la inoculación, se recogen muestras de exudados nasales o faríngeos de los animales diariamente durante 10 días, y se determina la cantidad de virus excretada por los animales infectados por análisis de PCR cuantitativo o titulaciones de virus. Por tanto, la inmunidad obtenida inducida por la vacuna puede ser confirmada cuantificando la elevación de los títulos de anticuerpos y el nivel de protección contra la infección por el virus de inoculación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula replicable de un virus de la gripe sin el uso de virus auxiliar, que comprende cultivar una célula transfectada con 7 u 8 ácidos nucleicos, en donde dichos ácidos nucleicos comprenden respectivamente un segmento génico del virus de la gripe y un promotor de polimerasa de bacteriófago o los ácidos nucleicos comprenden respectivamente el complemento de un segmento génico del virus de la gripe y un promotor de polimerasa de bacteriófago, y en donde la célula está provista adicionalmente de una polimerasa de bacteriófago.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los ácidos nucleicos usados en dicho método no comprenden un terminador de polimerasa de bacteriófago.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde los ácidos nucleicos usados en dicho método han sido provistos con al menos un residuo de guanina adicional próximo al promotor de la polimerasa de bacteriófago.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los ácidos nucleicos usados en dicho método han sido provistos con dos residuos de guanina adicionales próximos al promotor de la polimerasa de bacteriófago.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho promotor de la polimerasa de bacteriófago es el promotor de la polimerasa de T7.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la transfección de la célula es con doce, plásmidos unidireccionales que expresan ocho ácidos nucleicos vRNA del virus de la gripe, así como la nucleoproteína del virus de la gripe y las proteínas polimerasas PA, PB1 y PB2.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde al menos un ácido nucleico usado en dicho método comprende un segmento génico de virus de la gripe procede de un virus de la gripe recomendado por la Organización Mundial de la Salud para fines vacunales.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al menos un ácido nucleico usado en dicho método comprende un segmento génico del virus de la gripe A.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha polimerasa de bacteriófago comprende una señal de localización nuclear.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha polimerasa de bacteriófago es polimerasa de T7.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la célula usada en el método es una célula que no es de primate.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la célula usada en el método es una célula de MDCK o una célula CEF.
13. Una preparación celular transfectada con los ácidos nucleicos de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
14. Una composición que comprende una preparación celular de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 14, para la producción de una composición farmacéutica dirigida a generar protección inmunológica contra la infección de un sujeto por un virus de la gripe.
16. Composición de acuerdo con la reivindicación 14, para uso en la generación de protección inmunológica contra la infección de un sujeto por un virus de la gripe.
17. Un ácido nucleico que comprende un segmento génico de un virus de la gripe y un promotor de polimerasa del bacteriófago T7, en donde dicho ácido nucleico ha sido provisto con al menos un residuo de guanina adicional próximo a dicho promotor, o un ácido nucleico que comprende el complemento de un segmento génico de un virus de la gripe y un promotor de polimerasa del bacteriófago T7, en donde dicho ácido nucleico ha sido provisto con al menos un residuo de guanina adicional próximo a dicho promotor.
18. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 17, que ha sido provisto con dos residuos de guanina adicionales próximos al promotor.
19. El ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18, que comprende un segmento génico que procede de un virus de la gripe virus recomendado por la OMS para fines vacunales.

ES 2 395 813 T3

20. El ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que comprende un segmento génico del virus de la gripe A.
21. Una célula provista de al menos un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20.
- 5 22. La célula de acuerdo con la reivindicación 21, que está provista adicionalmente de una polimerasa del bacteriófago T7.
23. La célula de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicha polimerasa comprende una señal de localización nuclear.
24. Una célula que no es de primate de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23.
- 10 25. La célula de acuerdo con la reivindicación 24, que es una célula de MDCK o una célula CEF.
26. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, que no ha sido provista de un virus auxiliar.
27. Uso de una célula de acuerdo con la reivindicación 13, para la producción de una composición farmacéutica dirigida a generar protección inmunológica contra la infección de un sujeto por un virus de la gripe.
- 15 28. Uso de una célula de acuerdo con la reivindicación 21, para la producción de una composición farmacéutica dirigida a generar protección inmunológica contra la infección de un sujeto por un virus de la gripe.

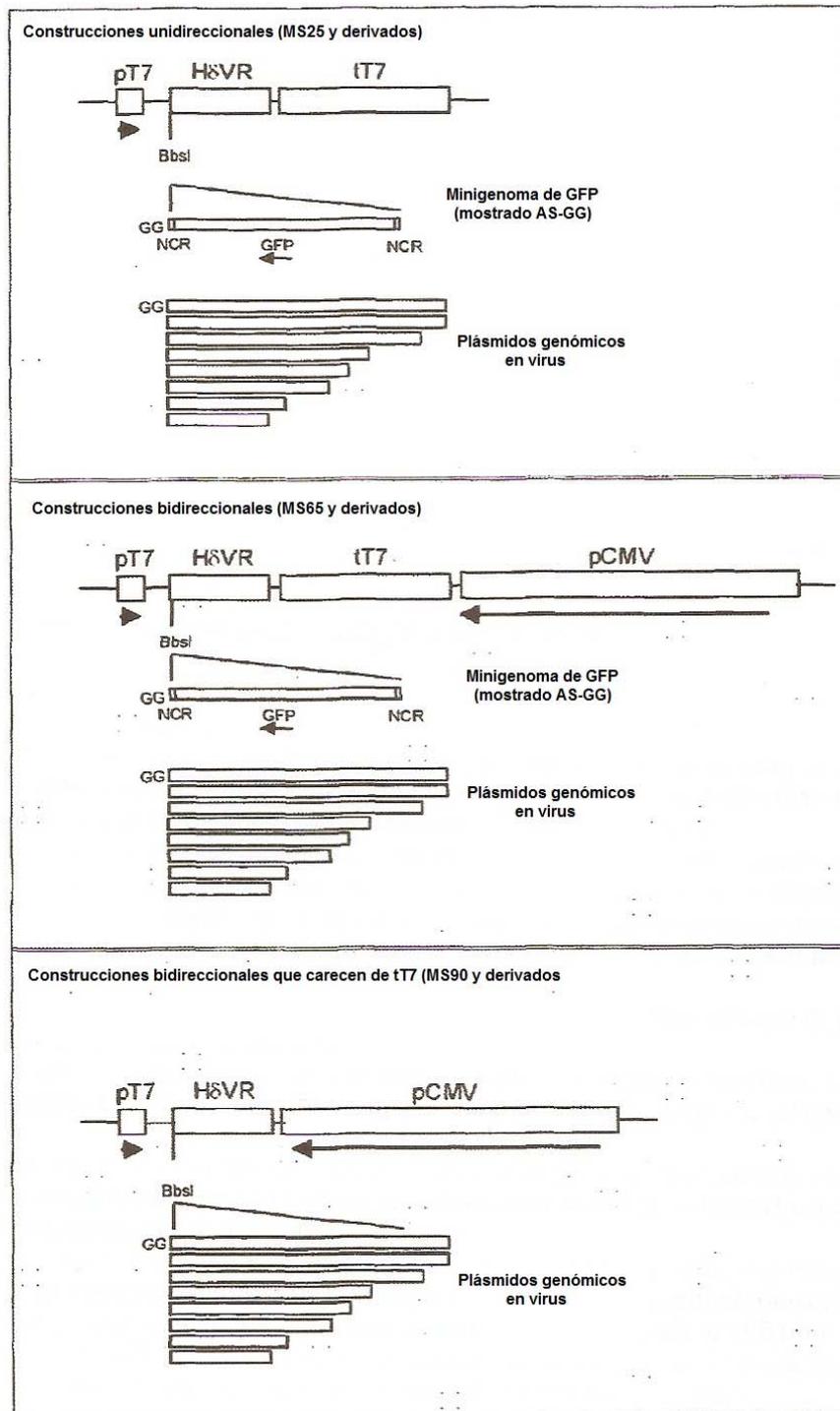


FIGURA 1

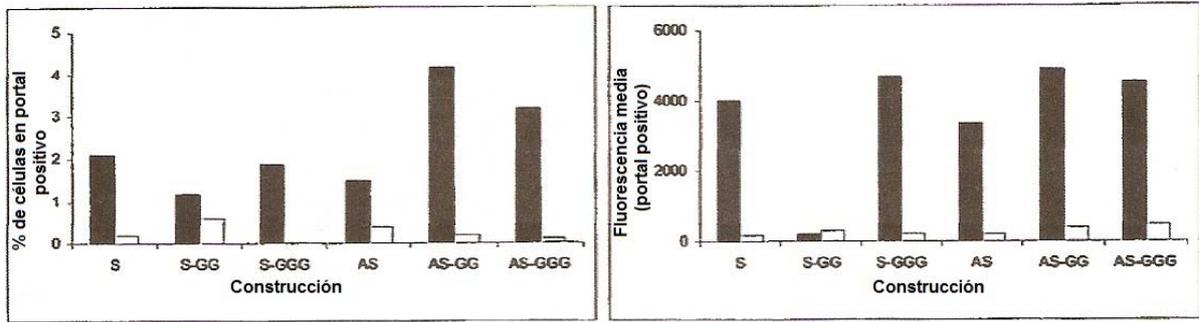


Figura 2

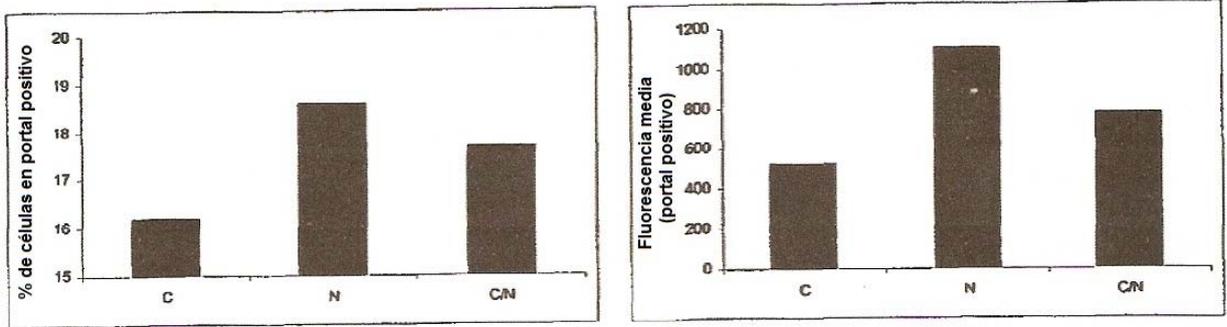


Figura 3

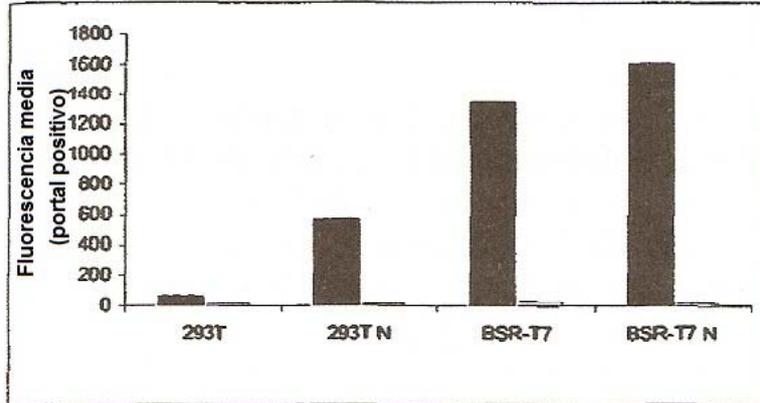


Figura 4

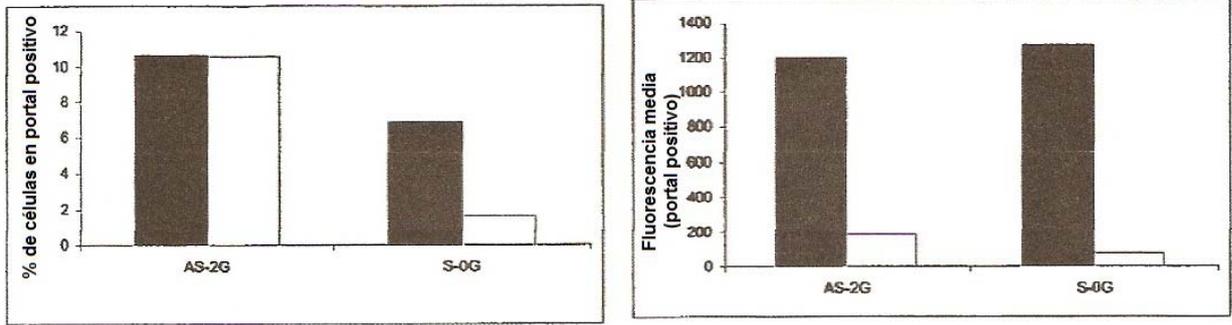


Figura 5

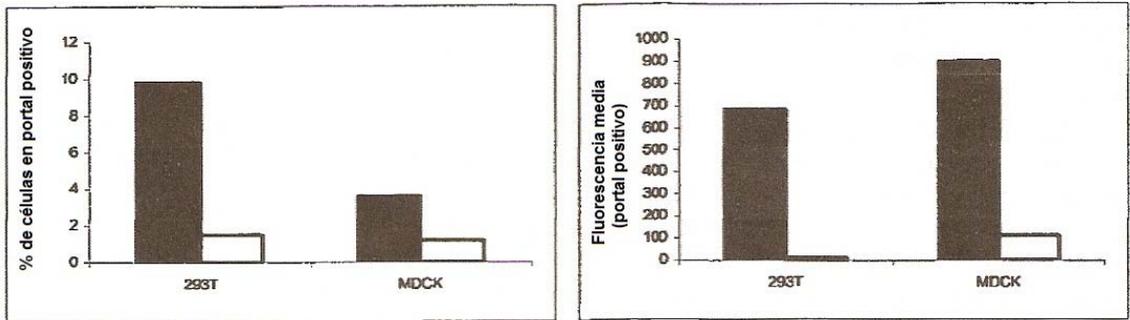


Figura 6