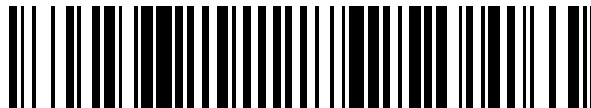


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 104**

51 Int. Cl.:

A61K 39/13 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007** **E 07789191 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012** **EP 2049153**

54 Título: **Poliovirus atenuados**

30 Prioridad:

10.08.2006 GB 0615933

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

17.04.2013

73 Titular/es:

**HEALTH PROTECTION AGENCY (100.0%)
7th Floor Holborn Gate, 330 High Holborn
London WC1V 7PP, GB**

72 Inventor/es:

MACADAM, ANDREW

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 401 104 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

Poliovirus atenuados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a poliovirus atenuados, a su preparación y a las vacunas que los contienen. Más específicamente, la invención se refiere a poliovirus que se atenúan y estabilizan genéticamente por la introducción de mutaciones definidas en sus genomas. Estos poliovirus son particularmente útiles como bases para vacunas de polio inactivadas.

Antecedentes de la invención

Las vacunas de polio atenuadas desarrolladas por Sabin en la década de 1950, se han utilizado por todo el mundo. Las cepas vacunales derivadas de cada uno de los tres serotipos de poliovirus, denominados tipos Sabin 1, 2 y 3, se preparaban por pases de los virus del tipo silvestre en cultivos celulares y animales vivos, hasta que se obtenían cepas atenuadas. Estos virus atenuados son sustancialmente menos capaces de causar poliomielitis en seres humanos que las cepas originales del tipo silvestre. Se administran por vía oral y se replican en el intestino para inducir una respuesta inmunitaria protectora.

Aunque las vacunas orales de poliovirus vivo se consideraban en general seguras, su uso se asoció con una pequeña incidencia de parálisis en los vacunados. Esta se asociaba sobre todo con los serotipos 2 y 3 y raramente, si acaso, con el tipo 1. Por eso, se han hecho esfuerzos para desarrollar vacunas tipo 2 y tipo 3 mejoradas, que fueran al menos comparables en seguridad con la excelente cepa tipo 1.

Las cepas vacunales Sabin se desarrollaron esencialmente por métodos empíricos. La base genética de su atenuación no se comprende por completo. Durante los últimos años, sin embargo, los científicos han empleado varias técnicas biológicas moleculares en un intento de aclarar el mecanismo por el cual se reduce la neurovirulencia de estas cepas vacunales. La mayoría de los trabajos se han concentrado en los serotipos 1 y 3. Para ambos, se han comparado las secuencias completas de nucleótidos de las cepas vacunales con las de sus progenitores neurovirulentos.

En el caso del poliovirus tipo 1, las cepas vacunales difieren de su progenitor en 47 posiciones de las 7441 del genoma base (Nomolo et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 79:5793-5797, 1982). Todas ellas son mutaciones puntuales simples y 21 de ellas provocan cambios de aminoácidos en las proteínas codificadas por el virus. Aunque se cree que varias mutaciones contribuyen al fenotipo de atenuación de la cepa vacunal, se ha presentado una prueba directa de que la mutación de A-G en la posición 480 de la región no codificante 5' del genoma tiene un marcado efecto atenuante sobre el virus (Nomolo et al., UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New Series, 54 (Eds M.A Brinton R.R. Rueckert): 437-452, New York: Alan R. Liss Inc., 1987)).

Estudios análogos en poliovirus tipo 3 revelan solo 10 diferencias en la secuencia de nucleótidos en las 7432 bases del genoma entre la cepa vacunal y la de su progenitor (Stanway et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:1539-1543, 1984). Solo tres de estas provocan sustituciones de aminoácidos en las proteínas codificadas por los virus. Las posiciones de las bases en la región no codificante 5' del genoma del poliovirus tipo 3 se numeran en el presente documento de acuerdo con el sistema de numeración de Stanway et al., 1984.

La construcción de recombinantes definidos entre la cepa vacunal Sabin tipo 3 y su cepa progenitora ha permitido la identificación de mutaciones que contribuyen al fenotipo de atenuación. Una de estas es en la posición 2034 y causa un cambio de serina a fenilalanina en la proteína VP3 vírica.

La otra mutación de interés es C (progenitor) a U (cepa vacunal) en la posición 472 de la región no codificante 5' del genoma. Se ha observado que esta mutación U 472 se invierte a C 472 del progenitor (tipo silvestre) rápidamente una vez que el virus se replica en el intestino del ser humano (Evans et al., Nature 314:548-550, 1985). Esta inversión se asocia con un incremento de la neurovirulencia. La C en la posición 472 se ha mostrado esencial para el crecimiento de un virus recombinante ratón/humano en el cerebro de ratón (La Monica et al., J. Virol. 57:515-525, 1986). Más recientemente, se ha observado que la A cambia a G en la posición 481 del poliovirus tipo 2, de nuevo en la replicación del virus en el intestino de los vacunados (Macadam et al., Virología 181: 379-392, 1991).

Se propuso anteriormente un modelo de la estructura secundaria de la región no codificante 5' del genoma de la cepa Leon del poliovirus tipo 3 (Skinner et al., J. Mol. Biol. 207: 379-392, 1989). En lo que concierne al dominio V (nucleótidos 471-538), las bases en las posiciones 471-473 y 477-483 están emparejadas con las bases en las posiciones 538-536 y 534-528 respectivamente como sigue:

	471		477		483
...	UCC	...	CCAUGGA	...	
...	AGG	...	GGUGCCU	...	
	538		534		528

5 Por conveniencia, las regiones emparejadas se denominan tallo (a) (471-473/534-536) y tallo (b) (477-483/534-528). Previamente, se descubrió que un poliovirus tipo 3 con el par de bases 472-537 invertido, por ejemplo 472 G y 537 C, estaba atenuado. Además, este virus atenuado tenía un valor de DL_{50} ligeramente más bajo que el poliovirus correspondiente que solo tenía la mutación C a G en la posición 472 pero que retenía la G del tipo silvestre en la posición 537. Los poliovirus atenuados en los que los pares de bases del tallo (a) o el tallo (b) del dominio V están invertidos se desvelan en el documento EP-A-0383433. Sin embargo, experimentos posteriores demostraron que el poliovirus tipo 3 en el que el par de bases en 472-537 está invertido no está tan atenuado como el tipo 3 de la cepa vacunal Sabin.

15 Se ha informado anteriormente de la producción de poliovirus atenuados que tienen sustancialmente la misma atenuación o mayor atenuación que la cepa vacunal Sabin (por lo que son seguros para usarlos) pero que son mucho más estables genéticamente. Estos poliovirus atenuados no tienen un par de bases U-G u otro par de bases mal emparejado en el tallo (a) o (b) del dominio V de la región no codificante 5' del genoma del poliovirus. (Se considera un emparejamiento malo la desviación del emparejamiento de bases de Watson-Crick). Más específicamente, se prepararon poliovirus de tipo 3 que contenían los siguientes pares de bases U-A:

20 (a) S15: U-A en 472-537, U-A en 480-531 y U-A en 481-530; o
(b) S16: U-A en 472-537, U-A en 480-531 y A-U en 482-529.

En condiciones en las que se seleccionaban rápidamente variantes neurovirulentas de Sabin 3, los fenotipos de atenuación de esas cepas de poliovirus fueron estables (Documento WO98/41619).

25 Como resultado del éxito del programa global de erradicación de la polio, la proporción de casos atribuible a las cepas derivadas de vacunas se ha incrementado dramáticamente y continuará haciéndolo hasta que cese la vacunación con virus vivos. En parte como respuesta a esto, muchos países desarrollados ya han cambiado a las vacunas de polio inactivadas (VPI) que se producen actualmente a partir de cepas silvestres. Cuando la polio silvestre se erradique, las cepas silvestres requerirán altos niveles de contención biológica, que puede que no sean fáciles de conciliar con la escala de producción requerida para VPI, haciendo atractivo el uso de cepas vacunales atenuadas para la fabricación de VPI, aunque se ha argumentado que ambas, la cepa silvestre y la cepa atenuada básicamente presentan los mismos problemas de contención.

35 Sigue existiendo la necesidad de cepas de poliovirus que no sean infecciosos para humanos a los niveles de exposición que se encuentran potencialmente en las instalaciones de producción de vacunas. Esto reduciría significativamente la posibilidad de escape en el entorno y las consecuencias del escape serían insignificantes incluso después de que la vacunación con virus vivo haya cesado. Tales cepas se pueden cultivar a niveles de contención que no sean prohibitivos para los fabricantes de vacunas.

40 Sumario de la invención

Últimamente, se han diseñado y construido cepas de poliovirus que pueden resolver la seguridad y los problemas de contención de los virus de base de VPI actuales. Estas cepas crecían con títulos tan altos como los de las cepas Sabin en cultivos celulares a 33 °C, pero la infectividad a 37 °C se reducía significativamente, incluso más de un millón de veces en un caso. Esta cepa tipo 3 se mostró completamente atenuada, sin causar síntomas clínicos en ninguno, cuando se inoculaba intraespinalmente en ratones TgPVR a una dosis 5.000 veces más alta que la dosis de Sabin 3 requerida para paralizar el 50% de los ratones. Las cepas también se diseñaron para ser genéticamente estables utilizando una estrategia que implica la manipulación de la estructura del ARN secundario en el dominio V de la región 5' no codificante. Las secuencias de las proteínas de la cápside no se han cambiado en estas cepas, por lo que se espera que la inmunogenicidad de las preparaciones inactivadas no esté disminuida.

55 En consecuencia, la presente invención proporciona un poliovirus atenuado que no tiene un par de bases U-G o un par de bases mal emparejada en el tallo (a) o (b) del dominio V de la región 5' no codificante del genoma del poliovirus y en el que al menos siete de los pares de bases en los tallos (a) y (b) son pares de bases U-A o A-U. Preferentemente, al menos cinco de los pares de bases en el tallo (b) son pares de bases U-A o A-U. Los poliovirus pueden ser poliovirus de tipo 1, tipo 2 o tipo 3. Se prefiere un poliovirus atenuado tipo 3 en el que la región no codificante 5' del genoma del poliovirus contenga un par de bases U-A en las posiciones 472-537, 478-533, 480-531 y 481-530. Particularmente preferidos son los poliovirus atenuados que adicionalmente contienen un par de bases A-U en la posición 482-529 o 477-534, o en ambas. "Atenuado" significa atenuado con respecto al poliovirus tipo silvestre que es el progenitor de las cepas Sabin vacunales relevantes (cada cepa tiene su propio progenitor) y también con respecto a la cepa Sabin vacunal. En conjunto, el virus tiene que estar lo suficientemente atenuado para no ser infeccioso para los seres humanos.

La presente invención también proporciona:

- un poliovirus de la invención que está inactivado;
 - un poliovirus inactivado de la invención para su uso en una vacuna;
 - 5 - una vacuna que comprende un poliovirus inactivado de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
 - el uso de un poliovirus de la invención como base de una vacuna de polio inactivada; y
 - un método para la preparación de una vacuna de polio inactivada, que comprende:
- 10 (i) el cultivo de un poliovirus atenuado de acuerdo con la invención;
- (ii) la inactivación de dicho poliovirus; y
- (iii) la formulación de dicho poliovirus inactivado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La Figura 1 muestra la estructura pronosticada del ARN secundario del dominio V (nucleótidos 471-538) de la cepa Sabin tipo 3. La región del tallo de bases emparejadas 471-473 y 536-538 es el tallo (a) y la región del tallo de bases emparejadas 477-483 y 528-534 es el tallo (b).
- 20 La Figura 2 muestra la secuencia de los tallos (a) y (b) del dominio V de las cepas vacunales Sabin de cada tipo de poliovirus. El dominio V de un poliovirus tipo 3 se extiende desde las posiciones 471-538. El dominio V de poliovirus de tipo 2 o tipo 1 se extiende desde las posiciones 468-535.
- La Figura 3 muestra la estructura pronosticada del ARN secundario del dominio V (nucleótidos 471-538) de la cepa de poliovirus atenuados designado S15 en la técnica anterior.
- 25 La Figura 4 muestra la estructura pronosticada del ARN secundario del dominio V (nucleótidos 471-538) de la cepa atenuada designada S17 en la técnica anterior.
- La Figura 5 muestra la estructura pronosticada del ARN secundario del dominio V (nucleótidos 471-538) de la cepa de atenuada designada S18 en la técnica anterior.
- La Figura 6 muestra la estructura pronosticada del ARN secundario del dominio V (nucleótidos 471-538) de la cepa atenuada designada S19 en la técnica anterior.
- 30 La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos de sensibilidad a la temperatura utilizando las cepas de poliovirus, Sabin 3, S15, S17 y S18. La reducción en el número de placas comparado con el número de placas a 33 °C se muestra en función de la temperatura, cuando se cultivan en células L20B, Vero y HEp2C.
- La Figura 8 muestra las curvas de crecimiento en una etapa de la cepa Sabin 3 (S3), S15, S17 y S18 cuando crecen en células HEp2C a 33 °C. DICT₅₀: Dosis infecciosa de cultivo tisular 50%.
- 35 La Figura 9 muestra la estabilidad de las mutaciones de atenuación en el dominio V de las cepas Sabin 2 y Sabin 1 en los pases por diferentes líneas celulares. Los virus se pasaron diez veces en diferentes células a 37 °C y luego se midieron las proporciones mutantes por PCR y digestión con endonucleasa de restricción (MAPREC). (A) Mutación en el nucleótido 481 en Sabin 2 durante el pase en células L20B (▲), y células Vero (■). (B) Mutación en Sabin 1 durante el pase en células Vero en los nucleótidos 480 o 525 (▲) y en el nucleótido 476 (■). (C) Mutación en Sabin 1 durante el pase en células L20B en los nucleótidos 480 o 525 (▲) y en el nucleótido 476 (■).
- 40 La Figura 10 muestra la estabilidad de 472U en Sabin 3 en pases por diferentes líneas celulares. Sabin 3 se pasó diez veces en diferentes células a 37 °C. El contenido en 472C se midió entonces por PCR y por digestión con endonucleasa de restricción (MAPREC). Símbolos: ◆, células L20B, ● células Vero, ▲ células MRC-5. Las células L20B son células L de ratón que expresan el receptor del poliovirus humano. Las células Vero y las células MRC-5 se utilizan para la producción de vacunas.
- 45

Descripción detallada de la invención

- 50 La invención proporciona un poliovirus atenuado que no tiene pares de bases mal emparejados en el tallo (a) o (b) del dominio V de la región no codificante 5' de su genoma, en el que al menos siete de estos pares de bases en los tallos (a) y (b) son U-A o A-U. Preferentemente, al menos cinco, como seis o siete, de los pares de bases en el tallo (b) son pares de bases U-A o A-U. Preferentemente al menos dos de los pares de bases en el tallo (a) son pares de bases U-A o A-U, por ejemplo tres de los pares de bases en el tallo (a) pueden ser pares de bases U-A o A-U.
- 55 Los poliovirus atenuados de la invención se han modificado de tal manera que los tallos (a) y (b) del dominio V no contienen el par de bases U-G u otra par de bases mal emparejada tal como el mal emparejamiento U-U en la cepa vacunal Sabin tipo 1. Preferentemente los tallos (c) y (d) tampoco contienen un par de bases U-G u otro par de bases mal emparejado. Un par de bases A-U o U-A alternativo se proporciona en lugar del par mal emparejado. De esta forma, un par de bases U-A está presente preferentemente en las posiciones 472-537 y 480-531 del dominio V de un poliovirus tipo 3, y en la posición 527-478 de un poliovirus tipo 2, reemplazando los pares de bases U-G (véase la Figura 2).
- 60 Además, los tallos (a) y/o (b) del dominio V se han modificado para reemplazar dos o más pares de bases G-C o C-G con pares de bases A-U o U-A. El tallo (b) del Sabin 3 contiene pares de bases C-G en las posiciones 477-534 y 478-533 y pares de bases G-C en las posiciones 481-530 y 482-529. Dos, tres o cuatro de estos pares de bases se
- 65

reemplazan con pares de bases U-A, A-U o una mezcla de A-U y U-A. El tallo (a) se puede también modificar para reemplazar el par de bases C-G en la posición 473-536 con un par de bases A-U o U-A, preferentemente un par de bases A-U.

5 En una realización, un poliovirus atenuado de acuerdo con la invención comprende el dominio V de la región no codificante 5' del poliovirus tipo 3 en el que el par de bases U-A está presente en la posición 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b). Un par más de bases A-U puede estar presente en la posición 482-529 en el tallo (b) y/o en la posición 477-534 en el tallo (b).

10 Los poliovirus tipo 1 y 2 pueden derivarse en correspondencia con la secuencia de los tallos (a) y (b) de los poliovirus silvestres neurovirulentos tipo 1 y tipo 2. Todas las cepas son preferentemente Sabin. De manera alternativa, el dominio V completo de un poliovirus tipo 3 de la invención puede reemplazar el dominio V completo de un poliovirus tipo 1 o tipo 2. Por ejemplo, la región no codificante 5' completa de un poliovirus tipo 3 de la invención puede reemplazar la región no codificante 5' de un poliovirus tipo 1 o tipo 2.

15 Las mutaciones de los poliovirus de la invención atenúan la virulencia de los virus y estabilizan genéticamente las cepas atenuadas de virus vivos vacunales, por tanto haciendo menos posible que reviertan a virulentos. Estas mutaciones también hacen los virus más seguros para producir un nivel de contención más bajo que el nivel de contención necesario para los virus del tipo silvestre utilizados para producir vacunas de polio inactivadas y el nivel de contención que sería necesario para cultivar las cepas Sabin atenuadas existentes para la producción de vacunas de polio inactivadas.

Un poliovirus atenuado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes puede estar inactivado.

25 La presente invención proporciona un proceso para la preparación de un poliovirus atenuado de la invención, en el que el proceso comprende:

- (i) introducir cada mutación o la mutación deseada por mutagénesis dirigida al sitio en una región subclonada, que incluye cada posición o la posición que se desea mutar, de una copia de ADN del genoma de un poliovirus.
- 30 (ii) reintroducir la región así modificada en una copia completa de ADN de la que derivó la región; y
- (iii) obtener el virus vivo de la copia de ADN así obtenido.

Una mutación puede introducirse de esta manera en una cepa de un poliovirus, normalmente una cepa Sabin, por mutagénesis dirigida al sitio de una copia de ADN que se corresponde con el ARN genómico de un poliovirus. Esto se puede conseguir por subclonación de una región apropiada de una copia de ADN infeccioso del genoma de un poliovirus en la cadena simple de ADN de un bacteriófago tal como el M 13.

40 Tras la introducción de cada mutación o la mutación, las copias de los ADN subclonados se reintroducen en la copia completa de ADN de la que derivaron. El virus vivo se recupera de la copia de ADN de longitud total mutada por producción de un ARN de sentido positivo típicamente utilizando un promotor T7 para dirigir la transcripción *in vitro* (Van der Werf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2330-2334, 1986).

45 El ARN recuperado se puede aplicar a cultivos tisulares utilizando las técnicas de referencia (Koch, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 61:89-138, 1973). Después de dos a tres días de incubación, los virus se pueden recuperar del sobrenadante del cultivo celular. El nivel de neurovirulencia y el de atenuación de los virus modificados pueden compararse entonces con el de los virus no modificados utilizando un ensayo de referencia DL₅₀ en ratones o el ensayo anteriormente mencionado de seguridad vacunal en monos aprobado por la OMS.

50 También se ha demostrado que la atenuación debida al debilitamiento del dominio V se correlaciona aproximadamente con la sensibilidad a la temperatura en células BGM (Macadam et al., Virology 181:451-458, 1991) o en células L20B (como se describe para las células CM-1 en Macadam et al., Virology 189:415-422, 1992). La sensibilidad a la temperatura de los virus modificados se puede determinar como un dato preliminar para determinar el nivel de atenuación esperado. Esto se puede expresar como la temperatura (T) a la que el número de unidades formadoras de placas (ufp) se reduce a potencias de 10 (1,0 log₁₀) a partir del número obtenido a, por ejemplo, 33 °C o 35 °C en las mismas células. Cuanto menor es el valor de T, mayor es el grado de atenuación.

60 Los poliovirus atenuados se pueden utilizar como vacunas vivas. Pueden, por tanto, formularse como composiciones farmacéuticas que además comprenden un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se puede emplear cualquier vehículo o diluyente utilizado convencionalmente en preparaciones de vacunas vivas. Por ejemplo, los poliovirus atenuados se pueden estabilizar en MgCl₂ 1 M acuoso y administrarse como una mezcla de los tres serotipos.

65 Los poliovirus atenuados pueden, por tanto, usarse para prevenir la poliomiélitis en un paciente humano. Con este propósito se pueden administrar por vía oral, como un pulverizador nasal, o por vía parenteral, por ejemplo por inyección subcutánea o intramuscular. Se puede administrar una dosis correspondiente a la cantidad administrada de una cepa Sabin vacunal convencional, tal como de 10⁴-10⁶ TCID₅₀.

Los poliovirus atenuados se pueden usar como virus de base de vacunas de polio inactivadas (VPI). En consecuencia, la presente invención proporciona un poliovirus atenuado inactivado de la invención y el uso de un poliovirus de acuerdo con la invención como base de una vacuna de polio inactivada (VPI). La invención también proporciona un método para preparar una vacuna de polio inactivada, que comprende:

- (i) cultivar un poliovirus atenuado de acuerdo con la invención;
- (ii) inactivar dicho poliovirus; y
- (iii) formular dicho poliovirus inactivado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El poliovirus puede inactivarse por cualquier método adecuado. Típicamente, se emplean los métodos utilizados para inactivar poliovirus del tipo silvestre en el uso actual de VPI. Por ejemplo, el poliovirus se puede inactivar con un tratamiento con formaldehído.

Las cepas de poliovirus atenuadas de la invención pueden inactivarse y combinarse con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Se puede emplear cualquier vehículo o diluyente que se utilice convencionalmente en preparaciones de virus inactivados, tales como preparaciones VPI. La preparación VPI puede comprender poliovirus inactivados tipo 1, tipo 2 y tipo 3.

Los poliovirus atenuados inactivados de la invención pueden por tanto usarse para vacunar contra poliomielitis en un paciente humano. Con este propósito, se pueden administrar por cualquier vía adecuada, tal como la vía parenteral. La administración parenteral puede ser por inyección subcutánea o intramuscular. Se puede administrar una dosis correspondiente a la cantidad administrada para una VPI convencional, tal como 8 a 40 unidades antigénicas D.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

30 Construcción y recuperación de los mutantes dirigidos al sitio

El S15, S17, S18 y S19 son derivados del tipo 3 de la vacuna de polio oral de la cepa Sabin 3. La derivación del clon del ADNc Sabin 3 y la construcción del S15 se han descrito previamente (Westrop et al., J. Virol. 63:1338-1344, 1989; documento WO 98/419619). Los nucleótidos mutados se muestran en negrita en las figuras 3 a 6, por lo demás, las secuencias son idénticas a Sabin 3. El remplazo de los pares de bases C-G por pares de bases U-A o A-U disminuye progresivamente la estabilidad termodinámica del dominio V; la retirada de todos los pares de bases U-G hace genéticamente estable la estructura, ya que cualquier mutación única debilitaría el par de bases relevante. Se necesitarían dos mutaciones simultáneas para enderezar la estructura y esto solo se podría conseguir cambiando un par de bases U-A por un par de bases C-G (o G-C).

Los virus se construyeron y recuperaron por los métodos de referencia. Más específicamente, S17, S18 y S19 se construyeron por mutagénesis PCR. Para cada plásmido, se amplificaron por PCR tres fragmentos de la región no codificante 5' de Sabin 3, utilizando cebadores que incorporan los cambios de la secuencia necesarios (como se muestra en las Figuras 4 a 6), localizados en los nucleótidos (a) 31-50 y 471-489, (b) 471-489 y 522-540 y (c) 522-540 y 755-778. Los tres fragmentos solapantes (a)-(c) se purificaron en gel, se mezclaron y reamplificaron con los cebadores externos y entonces el fragmento 747 pb que comprende la región no codificante 5' mutada se clonó en pCR2.1 (Invitrogen) y secuenció. Se ligaron los fragmentos M1ul-Sacl (279-751) con las secuencias correctas en clones Sabin 3 carentes del fragmento Sacl-Sacl (751-1900). Los clones infecciosos de longitud total se generaron por la adición de un fragmento parcial Sacl/Smal (2768).

En condiciones que seleccionaban rápidamente variantes neurovirulentas de Sabin 3, los fenotipos de atenuación de cepas de poliovirus S15 y S16 fueron estables (documento WO 98/41619). Con el fin de generar cepas genéticamente estables de los tres serotipos, toda la región no codificante 5' de Sabin 1 se reemplazó exactamente con la de la cepa S15 para crear la S15/1 y toda la región no codificante 5' de Sabin 2 se reemplazó exactamente con la de la cepa S15 para crear la S15/2.

Más específicamente, para preparar la S15/1, la región no codificante 5' de S15 se empalmó precisamente en la región codificante de Sabin 1 por mutagénesis PCR. El inicio de la región codificante del clon pT7/S1F de Sabin 1 se amplificó por PCR, se digirió con Sacl y AatII, y se purificó en gel. El plásmido pT7/S15 se digirió con EcoRI y Sacl, y el fragmento de 0,78 kb que contenía el promotor T7 y los primeros 751 nucleótidos del genoma se purificó en gel. Estos fragmentos se ligaron juntos en pT7/S1F digerido con EcoRI-AatII para producir un clon de plásmido de longitud total pT7/S15/1, que contenía la RNC 5' completa de S15 y la región codificante y la RNC 3' de Sabin 1, como se verificó por secuenciación de los primeros 1.200 nucleótidos del genoma. Como consecuencia de la estrategia de mutagénesis, se introdujo un cambio silencioso T→A en el segundo codón de la región codificante de pT7/S15/1 comparado con Sabin 1.

5 Para preparar la S15/2, la región no codificante 5' de T7/S15 se empalmó precisamente en la región codificante de Sabin 2 por PCR solapante. La RNC 5' de pT7/S15 y el inicio de la región codificante del clon pS2 de Sabin 2 se amplificaron; los fragmentos de solapamiento se purificaron en gel, mezclaron y reamplificaron con los cebadores externos NP7 y AM13; y los fragmentos resultantes se digirieron con NotI, y SacI, se purificaron en gel, y se ligaron en pS2 digerido con NotI-SacI para producir un clon de plásmido pT7/S15/2 de longitud total, que contenían la RNC 5' completa de S15 y la región codificante y la RNC 3' de Sabin 2, como se verificó por secuenciación de los primeros 1.500 nucleótidos del genoma. Aparte de la región no codificante 5' intercambiada no se introdujo ninguna mutación en la secuencia de la Sabin 2.

10 También se construyeron dos cepas S18 adicionales que comprendían secuencias de las cepas de vacuna de polio Sabin 1 (S18/1) y Sabin 2 (S18/2). S18/1 se generó cambiando el fragmento EcoRI-SacI de 0,78 kb de S18, que contenía el promotor T7 y los primeros 751 nucleótidos del genoma, en S15/1. S18/1 comprende la región no codificante 5' de S18 empalmada precisamente en las regiones codificante y no codificante 3' de Sabin 1. Para obtener S18/2, el fragmento MluI-BamHI (674) de S18 se cambió en un subclón de S15/2 y después se generó el clon de longitud total usando sitios MluI y SacI (1318) en S15/2. S18/2 comprende la región no codificante 5' de S18 empalmada precisamente en las regiones codificante y no codificante 3' de Sabin 2.

20 Los virus se recubrieron por transfección de monocapas de células HEp2C con $\geq 2\mu\text{g}$ de transcritos de T7 (Van der Werf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2330-2334, 1986) seguido por incubación a 33 °C durante 24-48 horas, tiempo en el que el efecto citopático completo fue aparente. Las secuencias de regiones no codificantes 5' se confirmaron después de la extracción de ARN y RT-PCR.

Sensibilidad a la temperatura

25 Se ha demostrado anteriormente que para las cepas de poliovirus genéticamente definidas que difieren solo en el dominio V de la región no codificante 5' del ARN, la sensibilidad a la temperatura de crecimiento está cuantitativamente relacionada con la estabilidad predicha del ARN plegado (Macadam et al., Virology 189:415-22, 1992).

30 Los ensayos de sensibilidad a la temperatura se llevaron a cabo utilizando células L20B, Hep2C y Vero, como se describió en la publicación anterior. En resumen, los virus se ensayaron por formación de placas a diferentes temperaturas. Estas se controlaron por incubación de las placas de cultivos celulares inoculadas en cajas de plástico selladas sumergidas en baños de agua cuya fluctuación de temperaturas era $< 0,01$ °C. Los gráficos de la Figura 7 muestran las curvas que representan la reducción en el número de placas comparada a 33 °C en función de la temperatura en tres líneas celulares diferentes.

40 Los resultados muestran que el debilitamiento de la estructura secundaria del ARN del dominio V tiene un impacto significativo en la capacidad del virus para replicarse a la temperatura corporal del ser humano en todas las células ensayadas. En las células L20B no había pruebas de replicación en absoluto de S18 a 37 °C, incluso usando una inoculación que contenía 5×10^5 unidades infecciosas.

Curvas de crecimiento en una etapa

45 Se infectaron láminas con células HEp2C replicadas simultáneamente con los diferentes virus a una multiplicidad de infección de 10, se incubaron a 33 °C durante diferentes periodos y luego se recolectaron por congelación a -70 °C. Los títulos víricos en los lisados celulares se determinaron por métodos de referencia (a 33 °C). La cinética de replicación y los rendimientos del virus no fueron significativamente diferentes para ninguno de los virus. Los resultados se muestran en la Figura 8.

50 Fenotipos de atenuación

Durante los últimos 15 años se ha establecido y validado el uso de ratones transgénicos que expresan el receptor del poliovirus humano para evaluar la virulencia de los poliovirus.

55 La inoculación intraespinal de ratones transgénicos que expresan el receptor del poliovirus (ratón TgPVR) es un método altamente sensible de medición de la infectividad *in vivo* ya que la replicación del virus conduce a pérdida neuronal y signos clínicos obvios de parálisis. Menos de diez UFP de virus tipo silvestre normalmente son suficientes para paralizar el 50% de los ratones utilizando esta vía de inoculación (Chumakov et al., Dev. Biol. (Basel) 105:171-177, 2001). En el presente documento se utiliza la cepa Tg66-CBA de ratones, que es particularmente sensible a las cepas tipo 3, para evaluar la infectividad de los virus S15, S17, S18 y S19.

65 Los virus Sabin 3, S15, S17 y S18 se ensayaron por dos vías de diferentes sensibilidades, la vía intramuscular y la vía intraespinal. Los resultados iniciales utilizando estos virus se muestran en la Tabla 1. Ambos conjuntos de experimentos iniciales mostraron que S17 y S18 se atenuaron más (eran menos virulentos) que la cepa vacunal tipo 3 y S15. La S18 parecía completamente atenuada, sin producir síntomas clínicos en absoluto cuando se inoculó vía intraespinal en los ratones a una dosis más de 3.000 veces más alta que la DP_{50} de Sabin 3.

Se llevaron a cabo más análisis utilizando Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, S15, S17, S18, S19, S18/1 y S18/2 utilizando la vía intraespinal. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 2. La cepa S15 fue indistinguible de Sabin 3 en estos ensayos (Tabla 1). Los resultados para la cepa S17 mostraron que un cambio extra de los pares de bases C-G a U-A incrementaba la DP₅₀ más de 3000 veces. Las cepas S18 y S19 tenían uno y dos cambios C-G a U-A (o A-U) más en comparación con S17 y parecían completamente atenuadas incluso a dosis cercanas a 100.000 veces superiores a la DP₅₀ de Sabin 3.

La DP₅₀ de S18/1 fue más de un millón de veces mayor que la de Sabin 1 (Tabla 2), simplemente como resultado del cambio de la región no codificante 5'. Los datos para la S18/1 son consistentes con dos cambios extras de pares de bases C-G a U-A incrementando los valores de DP₅₀ más de 10⁶ veces.

Sabin 2 es la más atenuada de las tres cepas de vacunas de polio orales y tiene una DP₅₀ relativamente alta en ratones TgPVR (Dragunsky et al., Bull. World Health Organ. 81:251-60, 2003). La DP₅₀ de S18/2 por vía intraespinal fue incluso más alta que la de Sabin 2 en ratones Tg66-CBA (Tabla 2). Los datos para las cepas S18 y S18/1 sugieren que estarían varios órdenes de magnitud por encima de 10^{8,1} pero no fue práctico generar una preparación del virus con un título suficientemente alto para poder ensayarlo.

Ejemplo de referencia: Cepas genéticamente estables de los tres serotipos de poliovirus

Las estabildades de las cepas S15/1 y S15/2 se compararon con las de las cepas Sabin relevantes de la misma manera que para la cepa S15 utilizando modelos de cultivo celular que favorecían la reversión rápida a nucleótidos de atenuación (Figura 10).

La mutación atenuante principal en la región no codificante 5' de Sabin 2 es una A en el nucleótido 481 (equivalente al nucleótido 484 en la Figura 1) y una mutación de A a G en esta posición, que da como resultado una pérdida significativa de atenuación, se seleccionó rápidamente durante el pase de Sabin 2 en células L20B y células Vero a 37 °C (Figura 9A). En el tercer pase en células L20B, más del 60% de la población de Sabin 2 tenía una G en el nucleótido 481 y tras cuatro pases la selección estaba casi completa. En células Vero, más del 60% de la población de Sabin 2 tenía una G en el nucleótido 481 tras cinco pases y la selección estaba esencialmente completa tras 8-9 pases. No se observaron cambios en ningún nucleótido en el dominio V de la cepa S15/2 tras diez pases tanto en células L20B como en células Vero.

Se seleccionaron tres mutaciones diferentes en el dominio V de Sabin 1 durante la replicación en el intestino humano, todas las cuales reforzaban el emparejamiento de bases: 480 G a A, 525 U a C y 476 U a A (véase la Figura 2). Los nucleótidos 480 y 525 forman un par de bases con lo que las mutaciones se producen en una posición u otra en un virus, pero no en ambas. En las células Vero se seleccionaron las mutaciones en las tres posiciones en Sabin 1 a una tasa constante (Figura 9B) por eso tras seis pases la mitad de la población de virus tenía una mutación en 480 o 525 y más del 40% de la población de virus tenía una mutación en 476. Durante los últimos cuatro pases, la proporción de la población de virus que tenía una mutación en 480 o 525 se incrementó aproximadamente al 100%, principalmente debido a la mutación en el nucleótido 480. Las mutaciones en las tres posiciones también se seleccionaron en Sabin 1 durante los pases en células L20B (Figura 9C), aunque al contrario de los resultados en células Vero, las mutaciones en 476 se seleccionaron a una tasa más alta que en 480 y 525, así tras seis pases aproximadamente el 60% de la población de virus tenía una mutación en el nucleótido 476 y el 30% tenía una mutación en 480 o 525. No se observaron cambios en ningún nucleótido en el dominio V de la cepa S15/1 tras diez pases tanto en células L20B o células Vero.

Tabla 1
Fenotipos de Atenuación / neurovirulencia en ratones TgPVR
Valores de Log₁₀DP₅₀ en ratones TgPVR

	<i>i.m.</i>	<i>i.es.</i>
Sabin 3	9,65	3,6
S15	8,9	n.d.
S17	>9,3 (0/8) ¹	>7,1 (1/8)
S18	>9,4 (0/8)	>7,1 (0/8)

i.m. vía intramuscular
i.es. vía intraespinal
n.d. no determinado
DP₅₀ dosis parálitica (50%)¹ (Proporción de ratones paralizados a dosis máxima)

Tabla 2
Fenotipos de Atenuación / neurovirulencia en ratones TgPVR

Virus	DP50 <i>i.es.</i> / log ₁₀ CCID ₅₀
Sabin 1	2,25
S18/1	>8,6 (1/16)*
Sabin 2	6,4
S18/2	>8,1 (0/8)*
Sabin 3	3,6
S15	3,7
S17	>7,1 (4/16)*
S18	>8,4 (0/16)*
S19	>8,2 (0/16)*

i.es. vía intraespinal

DP₅₀ dosis paralítica (50%)

* paralizados / total a la dosis más alta

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL	
	<120> POLIOVIRUS ATENUADOS	
	<130> N98949A	
10	<150> GB 0615933.9	
	<151> 10-08-2006	
15	<160> 4	
	<170> PatentIn versión 3.4	
	<210> 1	
20	<211> 70	
	<212> ARN	
25	<213> Cepa de poliovirus Sabin tipo 3	
	<400> 1	
	auucuaacca uggagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguaa cgcgcaaguc	60
	cguggcggaa	70
30	<210> 2	
	<211> 70	
35	<212> ARN	
	<213> Cepa de poliovirus S15	
	<400> 2	
40	auucuaacca uggagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguaa cgcgcaaguc	60
	aauggcggaa	70

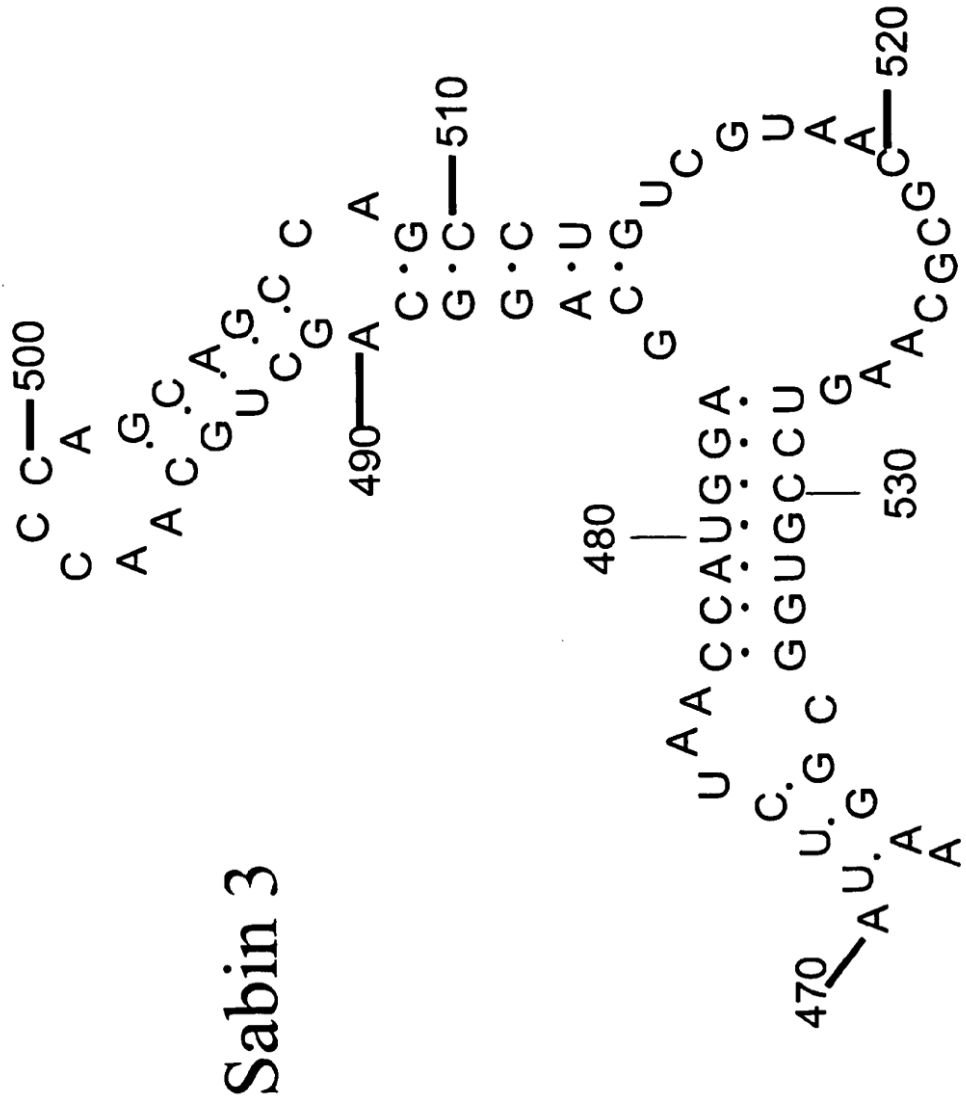
ES 2 401 104 T3

<210> 3
 <211> 70
 5 <212> ARN
 <213> Cepa de poliovirus S17
 10 <400> 3
 auucuaacua uugagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguaa cgcgcaaguc **60**
 aauagcgaaa **70**
 <210> 4
 15 <211> 70
 <212> ARN
 20 <213> Cepa de poliovirus S18
 <400> 4
 auucuaacua uuaagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguaa cgcgcaaguu **60**
 aauagcgaaa **70**
 25 <210> 5
 <211> 70
 30 <212> ARN
 <213> Cepa de poliovirus S19
 <400> 5
 35 <400> 5
 auucuaaaau uuaagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguaa cgcgcaaguu **60**
 aauaucgaaa **70**

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un poliovirus atenuado que no tiene un par de bases mal emparejado en el tallo (a) del dominio V de la región no codificante 5' de su genoma y no tiene un par de bases mal emparejado en el tallo (b) del dominio V de la región no codificante 5' de su genoma, en el que al menos siete de los pares de bases en los tallos (a) y (b) son pares de bases U-A o A-U.
- 10 2. Un poliovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos cinco de los pares de bases en el tallo (b) son pares de bases U-A o A-U.
- 15 3. Un poliovirus de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que seis de los pares de bases en el tallo (b) son pares de bases U-A o A-U.
4. Un poliovirus de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que siete de los pares de bases en el tallo (b) son pares de bases U-A o A-U.
- 20 5. Un poliovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dos de los pares de bases en el tallo (a) son pares de bases U-A o A-U.
6. Un poliovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que tres de los pares de bases en el tallo (a) son pares de bases U-A o A-U.
- 25 7. Un poliovirus atenuado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende el dominio V de la región no codificante 5' del poliovirus tipo 3 en el que un par de bases U-A está presente en la posición 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b).
8. Un poliovirus de acuerdo con la reivindicación 7, en el que un par de bases A-U está presente en la posición 482-529 del tallo (b).
- 30 9. Un poliovirus de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que un par de bases A-U está presente en la posición 477-534 del tallo (b).
10. Un poliovirus atenuado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está inactivado.
- 35 11. Un poliovirus de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en una vacuna.
12. Una vacuna que comprende un poliovirus como se define en la reivindicación 10 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Uso de un poliovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como base de una vacuna de polio inactivada (VPI).
14. Un método para preparar una vacuna de polio inactivada, que comprende:
- 45 (i) cultivar un poliovirus atenuado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
(ii) inactivar dichos poliovirus; y
(iii) formular dicho poliovirus inactivado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1



Virus		Secuencia del dominio V								
		Tallo a				Tallo b				
Sabin 3	471		473	477						483
	<i>U</i>	<i>U</i>	C...C	C	<i>A</i>	<i>U</i>	G	G	<i>A</i>	
	<i>A</i>	<i>G</i>	G...G	G	<i>U</i>	<i>G</i>	C	C	<i>U</i>	
	538		536	534						528
Sabin 2		Tallo a				Tallo b				
	468		470	474						480
	<i>U</i>	<i>C</i>	C...C	C	<i>A</i>	<i>C</i>	G	G	<i>A</i>	
	<i>A</i>	<i>G</i>	G...G	G	<i>U</i>	<i>G</i>	<i>U</i>	C	<i>U</i>	
535		533	531						525	
Sabin 1		Tallo a				Tallo b				
	468		470	474						480
	<i>U</i>	<i>C</i>	C...C	C	<i>U</i>	<i>C</i>	G	G	<i>G</i>	
	<i>A</i>	<i>G</i>	G...G	G	<i>U</i>	<i>G</i>	C	C	<i>U</i>	
		533	531							
Consensus		Tallo a				Tallo b				
	<i>U</i>	<i>C</i>	C...C	C	<i>U</i>	<i>C</i>	G	G	<i>G</i>	
	<i>A</i>	<i>G</i>	G...G	G	<i>U</i>	<i>G</i>	C	C	<i>U</i>	

Negrita Par de bases conservada
Cursiva Nucleótido de tipo específico

Fig. 2

Fig. 3

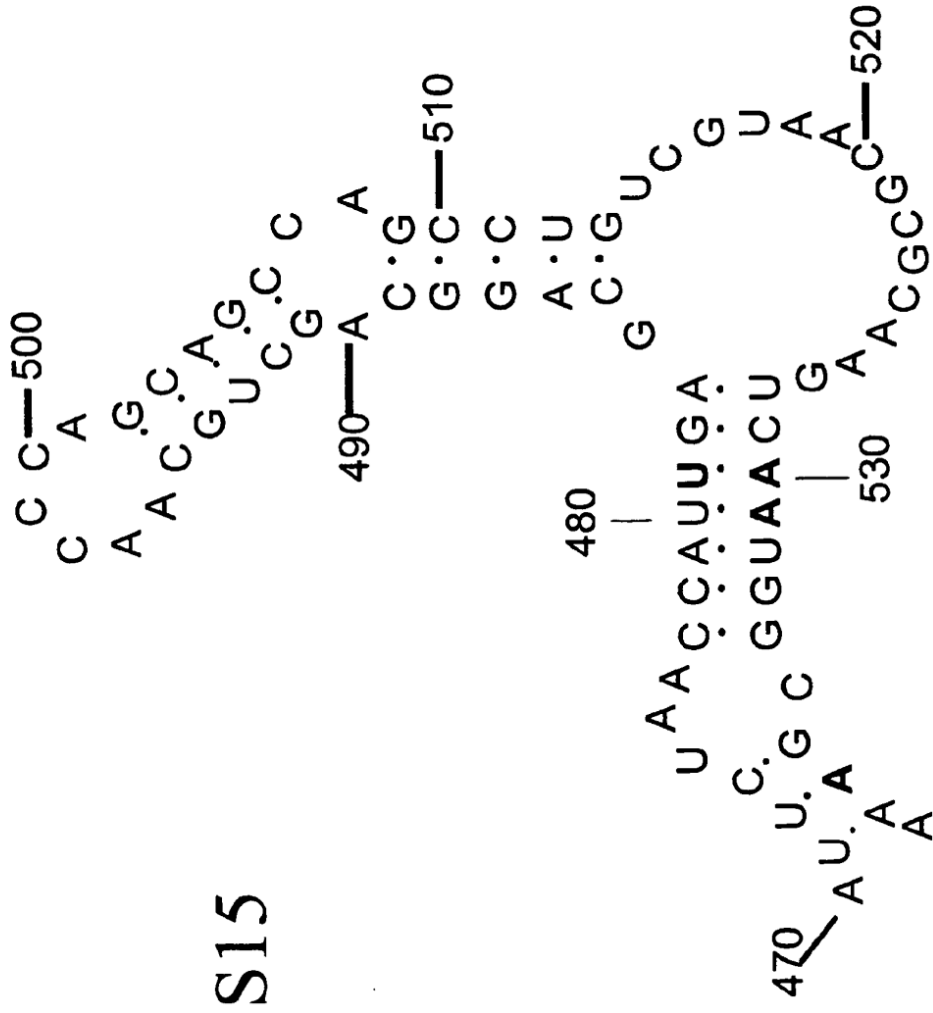


Fig. 4

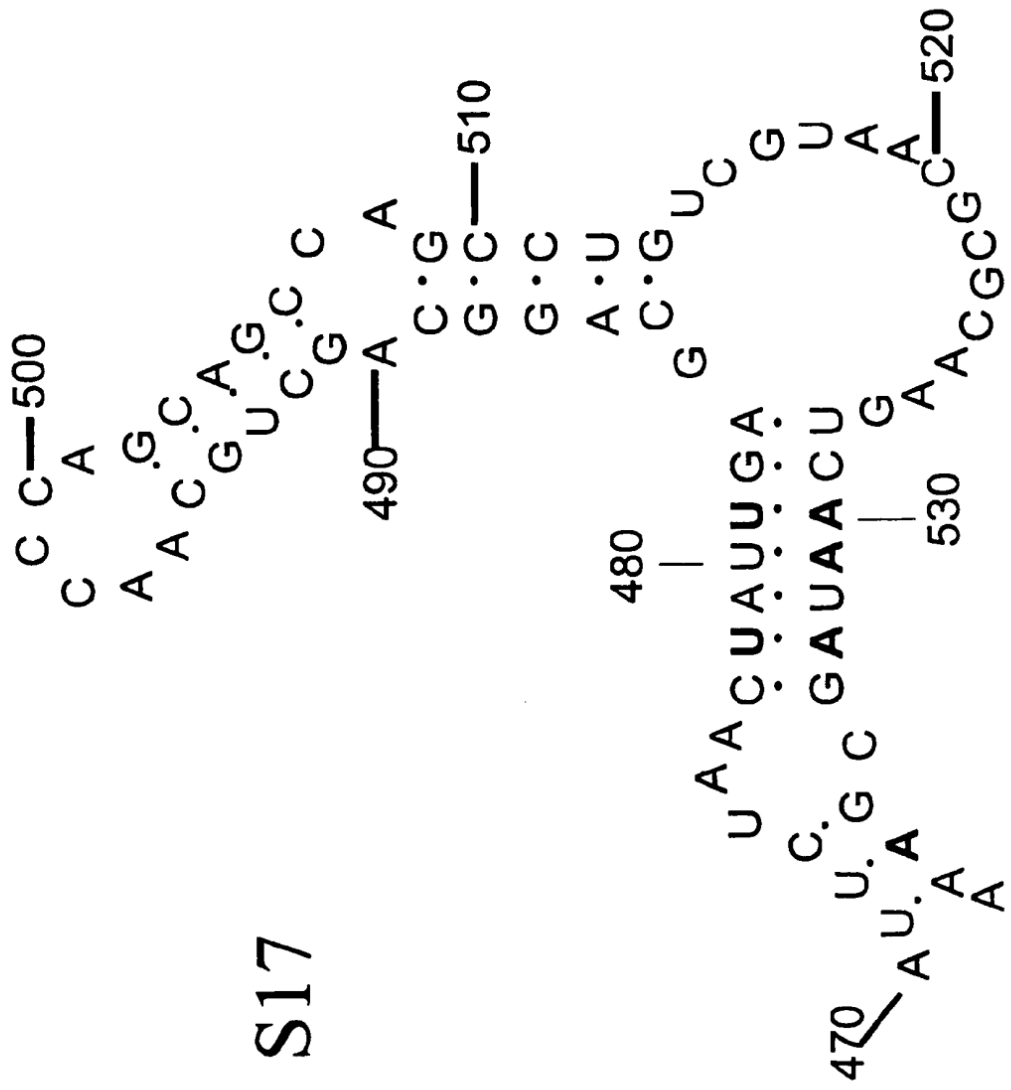
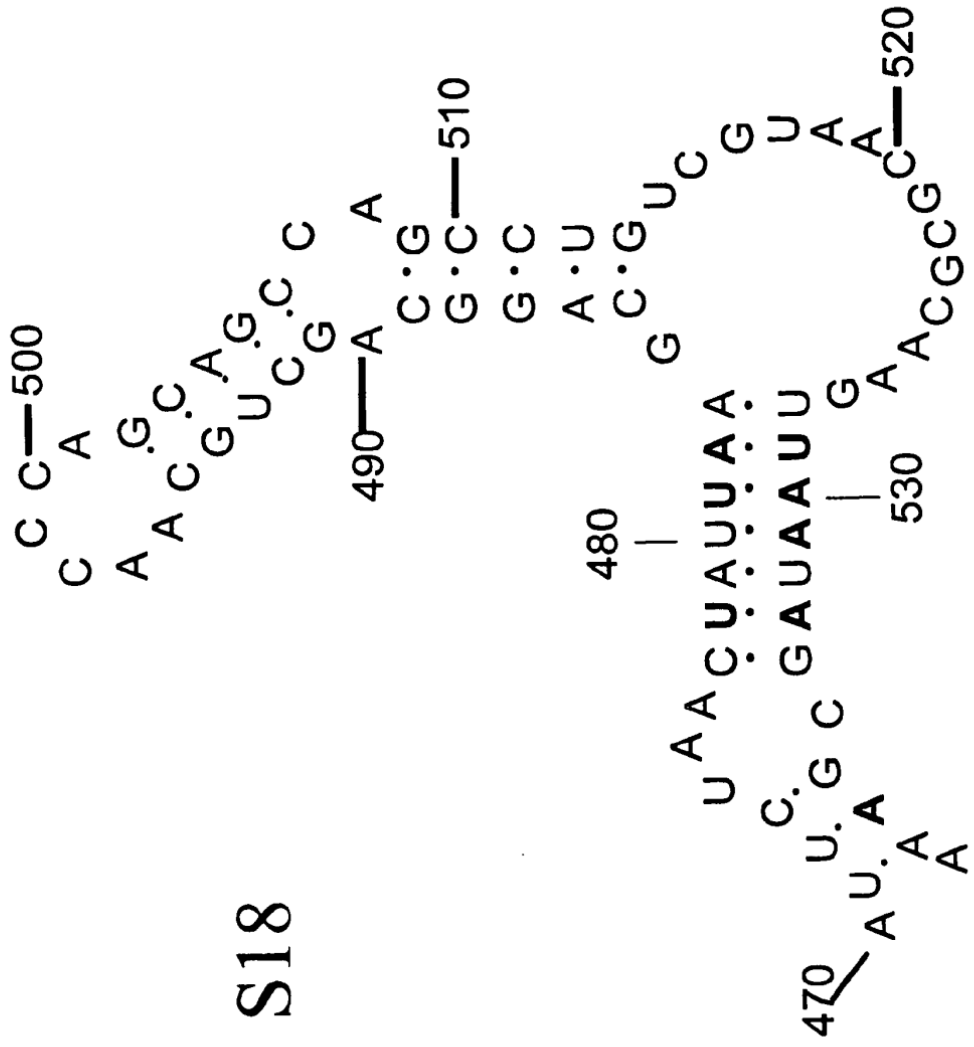


Fig. 5



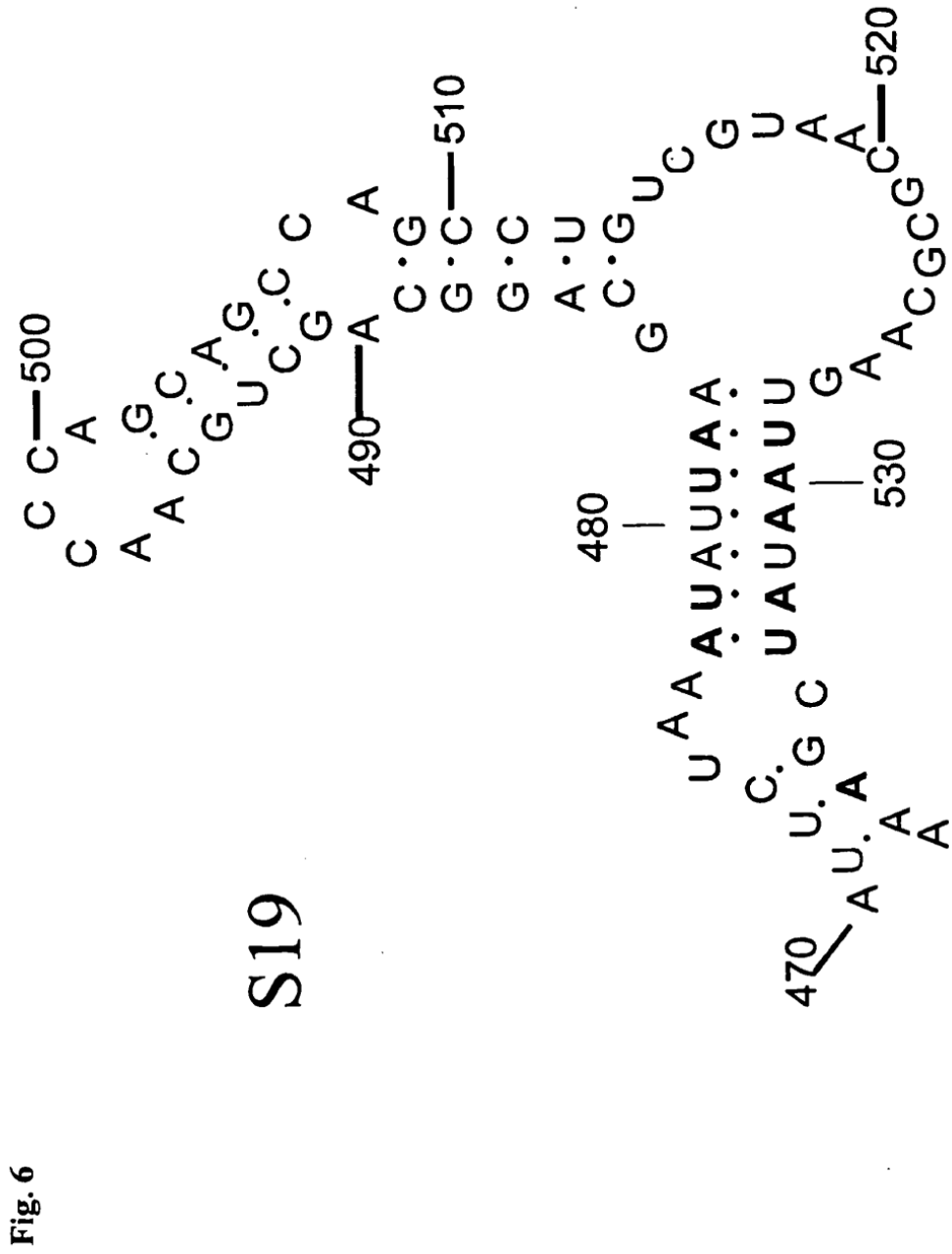


Fig. 7

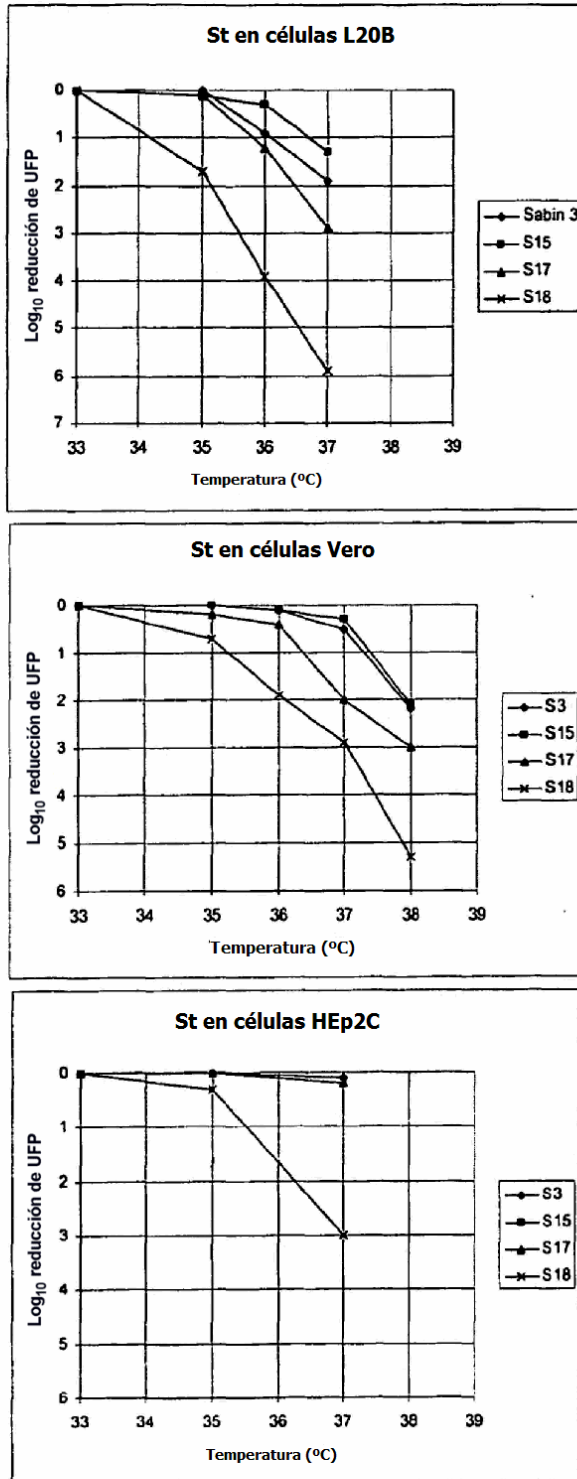


Fig. 8

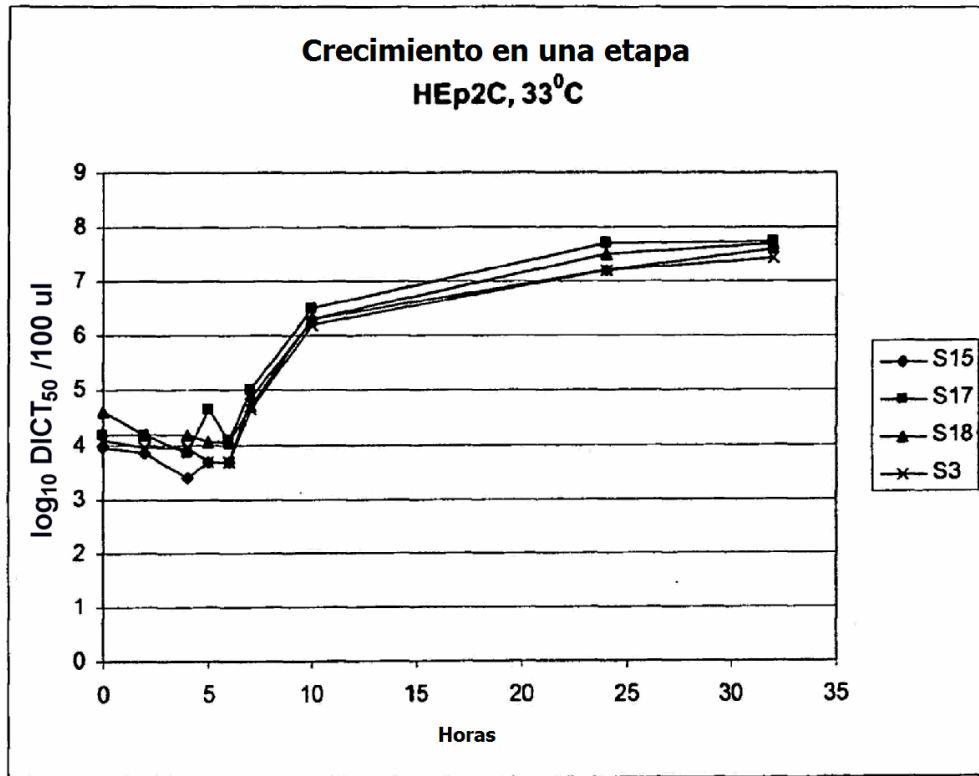


Fig. 9

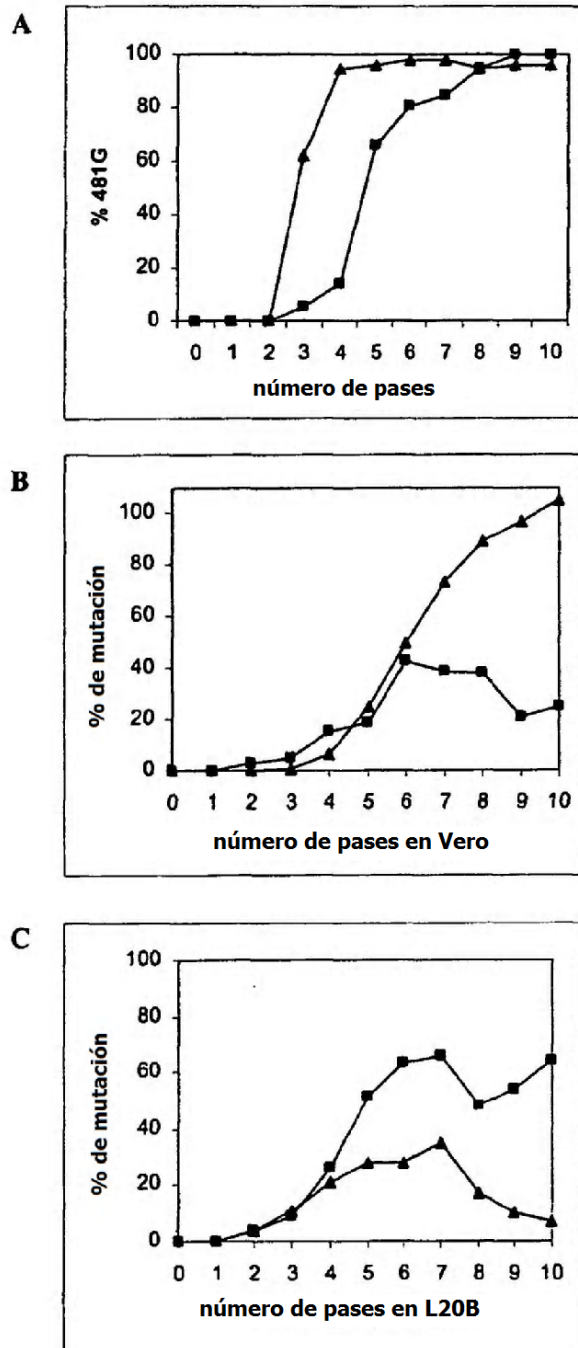


Fig. 10

