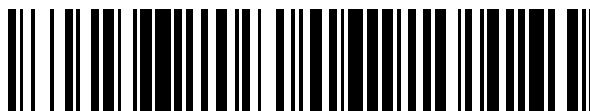


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 178**

51 Int. Cl.:

A61K 39/13 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2011** **E 11807966 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2658571**

54 Título: **Vacuna inactivada contra la poliomielitis**

30 Prioridad:

29.12.2010 GB 201022077

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

15.06.2016

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH
(100.0%)
Richmond House, 79 Whitehall
London SW1A 2NS, GB**

72 Inventor/es:

MACADAM, ANDREW

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 574 178 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

Vacuna inactivada contra la poliomiélitis

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a vacunas de la polio inactivadas. En particular, la presente invención se refiere a vacunas de la polio inactivadas, virus de la polio atenuados utilizados en la producción de vacunas de la polio inactivadas y a la preparación de tales vacunas de la polio inactivadas.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La iniciativa de erradicación mundial de la poliomiélitis de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado grandes progresos. La principal herramienta utilizada en el programa ha sido la vacuna contra la polio oral viva atenuada. Esta vacuna viva atenuada se conoce desde hace muchos años para producir una vacuna asociada a la poliomiélitis en una pequeña proporción de receptores o sus contactos, y más recientemente para ser capaz de revertir a un fenotipo transmisible, causando brotes en varias partes del mundo donde los programas de vacunación se han vuelto menos vigorosos, ya que la polio ha desaparecido. La excreción prolongada de virus de la polio derivado de la vacuna por algunos pacientes inmunodeficientes también ha sido bien descrita. Por tanto, el uso de una vacuna oral contra la polio y su capacidad de alterar su fenotipo es un problema en la erradicación de la poliomiélitis en todo el mundo.

[0003] Sería muy imprudente detener la vacunación inmediatamente porque se crea que se ha aislado el último virus de tipo salvaje porque es posible que circule el virus de tipo salvaje sin ser detectado debido a la escasa vigilancia en algunas zonas. Además, las personas inmunodeficientes pueden continuar excretando virus durante un tiempo muy largo después de la vacunación y podrían ser una fuente de reemergencia. Además, todavía puede haber brotes causados por la vacuna oral de las últimas rondas de su uso.

[0004] Se indica que, por lo tanto, la vigilancia árida de la vacunación debe continuar durante algún tiempo después de la erradicación del virus de tipo salvaje. Esto requiere el uso de virus de la polio en laboratorios dedicados a la vigilancia y la producción de vacunas, que se referirá principalmente a la fabricación de vacuna contra la polio inactivada (IPV) del tipo desarrollado por Salk.

[0005] La vacuna Salk se basa en tres cepas virulentas de tipo salvaje del virus de la polio salvaje, en concreto las cepas Mahoney (virus de la polio tipo 1), MEF-1 (virus de la polio tipo 2), y Saukett (virus de la polio tipo 3), cultivadas en células Vero ex vivo (Wood et al, Biologicals 25: 59-64, 1997). Los virus de la polio de tipo salvaje se inactivan a continuación con formalina para producir la IPV. Las cepas de tipo salvaje que actualmente se utilizan en la producción de IPV son conocidas por ser parálíticas en los seres humanos y se utilizan en grandes cantidades en la producción de IPV. Esto presenta un serio problema de contención que puede no ser fácil de conciliar con las escalas de producción necesarias para IPV. Algunos han expresado su interés en el uso de las mismas cepas en la fabricación de la vacuna inactivada como se usan en la vacuna oral sobre la base de que están atenuadas y por lo tanto presentan un menor riesgo caso si se escapan. Sin embargo, su inestabilidad en la replicación en los seres humanos significa que siguen siendo peligrosas, y sus propiedades inmunogénicas son diferentes de las de las cepas de tipo salvaje que actualmente se utilizan, de manera que sería necesario un importante programa de desarrollo clínico para desarrollar una IPV sobre la base de estas cepas.

[0006] Las vacunas de virus de la polio vivas atenuadas desarrolladas por Sabin en la década de 1950 utilizando procedimientos esencialmente empíricos se han utilizado en todo el mundo como vacunas de la polio orales vivas. En los últimos años, los científicos han empleado una serie de técnicas de biología molecular en un intento de elucidar el mecanismo por el cual se reduce la neurovirulencia de estas cepas vacunales. La mayoría del trabajo se ha concentrado en los serotipos 1 y 3. Para ambos las secuencias de nucleótidos completas de las cepas vacunales se han comparado con las de sus progenitores neurovirulentos. En el caso de virus de la polio de tipo 1, la cepa vacunal difiere de su progenitor en 47 posiciones en el genoma de 7441 bases (Nomoto et al, Proc Natl Acad Sci USA 79: 5793-5797, 1982). Estudios análogos sobre el virus de la polio tipo 3 revelan sólo hay 10 diferencias en la secuencia de nucleótidos en el genoma de 7432 bases entre la vacuna y su cepa progenitora (Stanway et al, Proc Natl Acad Sci USA 81: 1539-1543, 1984).

[0007] La cepa de tipo 2 se desarrolló a partir de una cepa parental atenuada de forma natural, pero el análisis de una cepa de reversión neurovirulenta, aislada de un caso de poliomiélitis asociada a la vacuna, identificó 17 diferencias de Sabin 2 (Pollard et al, J. Virol 63: 4949-4951, 1989).

[0008] Se ha propuesto previamente un modelo para la estructura secundaria de la región 5' no codificante del genoma de la cepa del virus de la polio tipo 3 (Skinner et al, J. Mol Biol 207: 379-392, 1989). En lo que respecta al dominio V (nucleótidos 471-538), las bases en las posiciones 471-473 y 477-483 están emparejadas con bases en las posiciones 538-536 y 534-528, respectivamente, de la siguiente manera:

	471	477	483
	... UCC ...	CCA	UGG ...
		A	
5	... AGG ...	GGU	GCC ...
		U	
	538	534	528

[0009] Para mayor comodidad, las regiones emparejadas se denominan tallo (a) (471-473/538-536) y tallo (b) (477-483/534-528). Los virus de la polio atenuados en los que un par de bases del tallo (a) o vástago (b) del dominio V se invierte se dan a conocer en el documento EP-A-0383433. Los virus de la polio atenuados que no tienen un par de bases U-G u otro desajuste de pares de bases (fuera del emparejamiento de bases de Watson-Crick) en el tallo (a) o (b) del dominio V de la región 5' no codificante del genoma del virus de la polio se describen en el documento WO98/41619 y WO 2008/017870. Estos virus de la polio atenuados tienen sustancialmente la misma atenuación que, o mayor atenuación que, la cepa vacunal parental de Sabin (de modo que son seguros para usar), pero son mucho más estables genéticamente.

Descripción resumida de la invención

[0010] Los presentes inventores han desarrollado cepas de virus de la polio recombinantes intertípicas para su uso como semillas de IPV. Las cepas de virus de la polio de la invención presentan propiedades inmunogénicas mejoradas y capacidades de crecimiento aumentadas en células de cultivo de tejidos. Las cepas de virus de la polio de la invención también son atenuadas y genéticamente estables, lo que las hace seguras para su uso en la producción de IPV. En particular, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los virus de la polio recombinantes intertípicos que comprenden una región 5' no codificante de Sabin 3, proteínas de la cápside de Sabin 1, Mahoney, MEF o Saukett y regiones codificantes no estructurales y regiones 3' no codificantes de Sabin 3 presentan propiedades inmunogénicas mejoradas en comparación con la cepa de Sabin 3 con las mismas modificaciones genéticas en la región 5' no codificante. Las cepas de virus de la polio de la invención pueden cultivarse en cultivo de tejidos y tienen la inmunogenicidad necesaria para actuar como semillas de IPV, pero no se replicarán en absoluto en seres humanos en caso de ser expuestos incluso a grandes cantidades.

[0011] Por consiguiente, la presente invención proporciona un virus de la polio recombinante atenuado que tiene:
(i) una región 5' no codificante que consiste en la región 5' no codificante de Sabin 3, modificada de manera que no tiene un desajuste de pares de bases en el tallo (a) o (b) del dominio V, en que:

(a) un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 479-532 y 482-529 en el tallo (b); o

(b) un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (A) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 477-534, 479-532 y 482-529 en el tallo (b);

y

(ii) una región codificante de la cápside P1 de la cepa Sabin 1, Mahoney, MEF o Saukett.

[0012] La presente invención también proporciona:

- un virus de la polio inactivado de la invención para usar en una vacuna;
- el uso de un virus de la polio de la invención como semilla de una vacuna contra la polio inactivada (IPV);
- una vacuna que comprende un virus de la polio inactivado y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante;
- un procedimiento para preparar una vacuna contra la polio inactivada, que comprende:
 - (i) crecer un virus de la polio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un cultivo celular *ex vivo*;
 - (ii) inactivar dicho virus de la polio; y
 - (iii) formular dicho virus de la polio inactivado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

[0013]

La figura 1 muestra la estructura secundaria de ARN predicha del dominio V (nucleótidos 471-538) de la cepa vacunal de tipo 3 de Sabin y las cepas S15, S17, S18 y S19. Las mutaciones introducidas en las cepas modificadas se muestran en negrita.

La Figura 2 muestra las estructuras genómicas de cepas modificadas basadas en S18. El sitio de restricción único, presente o introducido en la cepa S18, se utiliza para intercambiar las regiones codificante del dominio V y/o proteína de la cápside (P1). La nomenclatura del virus sigue el formato en el que "S19/MahP1" indica un virus con la secuencia del dominio V de S19, la secuencia de la cápside de Mahoney y la región codificante no estructural de Sabin 3.

La Figura 3 ilustra la sensibilidad a la temperatura de cepas de tipo 3 en diferentes células. Los virus se analizaron

mediante la formación de placas a diferentes temperaturas en células L20B, Vero, MRC5 y células Hep2C y los resultados se representaron en gráficos que muestran la reducción de PFU a cada temperatura en comparación con PFU a 31°C.

La figura 4 muestra el crecimiento en una etapa en células MRC5 a 33°C. Las láminas de células replicadas se infectaron de forma sincrónica con los virus de tipo 3, se incubaron a 33°C, a continuación se recogieron a diferentes tiempos y se determinaron los títulos de los virus.

Descripción detallada de la invención

[0014] El genoma del virus de la polio es una única molécula de ARN lineal que se traduce por la célula huésped como un polipéptido largo. El ARN del virus de la polio comprende un extremo 5' largo muy estructurado que no codifica para un producto polipéptido y contiene seis dominios, I a VI. Varios de estos dominios juntos (incluyendo el dominio V) comprenden un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), que determina el inicio de la traducción. La región codificante del ARN del virus de la polio se divide en dos regiones, una que codifica para proteínas estructurales que constituyen la cápside viral, y la otra que codifica para proteínas no estructurales, tales como proteasas virales, y una ARN polimerasa dependiente de ARN viral. La región 3' no traducida es menos compleja que la región 5' no codificante.

[0015] Los presentes inventores han desarrollado cepas recombinantes intertípicas de virus de la polio que poseen mutaciones en el dominio V de la región 5' no codificante, y así están atenuadas en comparación con las cepas del virus de la polio de tipo salvaje y son genéticamente estables. Las cepas de virus de la polio recombinantes intertípicas de la invención también tienen una o más regiones codificantes de la cápside P1 de las cepas del virus de la polio Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF o Saukett. Las proteínas de la cápside del virus de la polio forman la cubierta proteica que rodea a la partícula del virus de la polio. Por tanto, estas proteínas de la cápside están expuestas al sistema inmune del huésped y dirigen la respuesta inmune del huésped al virus de la polio. El cambio de la región codificante del virus de la polio recombinante intertípico permite manipular las propiedades inmunogénicas de los virus de la polio.

[0016] Por consiguiente, los virus de la polio atenuados de la invención comprenden la región 5' no codificante de Sabin 3, que ha sido modificada de modo que los tallos (a) y (b) del dominio V no contienen un desajuste de pares de bases, en que:

(a) un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 479-532 y 482-529 en el tallo (b); o

(b) un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (A) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 477-534, 479-532 y 482-529 en el tallo (b);

y el virus de la polio atenuado de la invención comprende también todas las proteínas estructurales de las cepas de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF o Saukett, preferiblemente de Sabin 1, Mahoney, MEF y/o Saukett y más preferiblemente de Mahoney, MEF y/o Saukett.

Modificación del dominio V

[0017] Los virus de la polio atenuados de la invención son genéticamente estables y seguros para su uso como semillas de IPV. Esto se consigue por debilitamiento de la estructura del dominio V en la región 5' no codificante mediante la sustitución de pares de bases GC por pares de bases AU, de manera que son necesarias dos mutaciones simultáneas para regenerar el tipo salvaje, y la sustitución de pares de bases GU por pares de bases de la AU para evitar la reversión a GC mediante una sola mutación y el consiguiente refuerzo de las estructuras. Se ha demostrado que los virus ajustados de manera que la estabilidad termodinámica del dominio V es la misma que la de la cepa de vacuna de tipo 3 de Sabin tienen las mismas propiedades biológicas, pero son estables en el paso (Macadam et al (2006) J Virol. 80 (17): 8653-63). El virus de la polio atenuado de la invención comprende una región 5' no codificante que consiste en la región 5' no codificante de Sabin 3, modificada de manera que no tiene un desajuste de pares de bases en el tallo (a) o (b) del dominio V, en el que siete u ocho de los pares de bases en los tallos (a) y (b) son pares de bases U-A o A-U.

[0018] En una realización, el virus de la polio atenuado de la invención comprende un dominio V modificado de la región 5' no codificante de Sabin 3 en el que un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 479-532 y 482-529 en el tallo (b). La secuencia del dominio V modificado puede ser:

AUUCUAACUAUUAAGCAGGCAGCUGCAACCCAGCAGCCAGCCUGUCGUA
ACGCGCAAGUUAUAGCGAAA (SEQ ID NO: 1).

[0019] En otra realización, el virus de la polio atenuado de la invención comprende un dominio V modificado de la región 5' no codificante de Sabin 3 en el que un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 477-534, 479-532 y 482-529 en el tallo (b). La secuencia del dominio V modificado puede ser:

AUUCUAAAUUAUUAAGCAGGCAGCUGCAACCCAGCAGCCAGCCUGUCGUA
ACGCGCAAGUUAUUAUCGAAA (SEQ ID NO: 2).

[0020] Los virus de la polio de la invención se pueden derivar correspondientemente de la secuencia de los tallos (a) y (b) de los virus de la polio de Sabin 1 o Sabin 2.

[0021] Las mutaciones en la región 5' no codificante de los virus de la polio de la invención atenúan la virulencia de los virus y estabilizan genéticamente los virus, lo que las hace menos propensas a revertir la virulencia. Por tanto, estas mutaciones hacen que el virus sea seguro para producir a un nivel de contención más bajo que el nivel de contención requerido para los virus de tipo salvaje que se utilizan actualmente para producir vacunas inactivadas contra la polio.

[0022] Las mutaciones en el dominio V se pueden introducir mediante cualquiera de los procedimientos estándar de mutagénesis conocidos en la técnica. Una mutación puede, por ejemplo, introducirse en una cepa de un virus de la polio, normalmente una cepa de Sabin, por mutagénesis dirigida al sitio de una copia de ADN correspondiente al ARN genómico de un virus de la polio. Esto se puede conseguir mediante subclonación de una región apropiada de una copia de ADN infeccioso del genoma de un virus de la polio en el ADN de cadena sencilla de un bacteriófago, tal como M13. Alternativamente, se puede sintetizar de manera completa *in vitro* una secuencia mutada.

[0023] Después de la introducción de la mutación o de cada mutación, las copias de ADN subclonado modificado vuelvan a introducirse en la copia de ADN completo de la que derivaban. El virus vivo se recupera de la copia de ADN de longitud completa mutado mediante la producción de un ARN de sentido positivo utilizando habitualmente un promotor T7 para dirigir la transcripción *in vitro* (Van der Werf et al, Proc Natl Acad Sci USA 83:2330-2334, 1986).

[0024] El ARN recuperado puede aplicarse a cultivos tisulares utilizando técnicas estándar (Koch, Curr Top Microbiol Immunol 61: 89-138, 1973). Después de dos a tres días de incubación, el virus se puede recuperar del sobrenadante del cultivo de tejidos. El nivel de neurovirulencia y por lo tanto de atenuación del virus modificado puede entonces compararse con la del virus no modificado utilizando una prueba LD₅₀ estándar en ratones que son transgénicos para el receptor del virus de la polio humano o la prueba de seguridad de la vacuna aprobada por la OMS en monos (WHO. Tech. Rep Ser 687: 107-175).

[0025] La atenuación debido al debilitamiento del dominio V también se ha demostrado que se correlaciona aproximadamente con la sensibilidad a la temperatura en células BGM (Macadam et al, Virology 181: 451-458, 1991) o en células L20B (tal como se describe para las células CM-1 en Macadam et al, Virology 189: 415-422, 1992). La sensibilidad a la temperatura del virus modificado se puede determinar de este modo como un cribado preliminar para determinar el nivel de atenuación esperado. Esto se puede expresar como la temperatura (T) a la que se reduce el número de unidades formadoras de placa (pfu) en una potencia de 10 (1,0 log₁₀) del número obtenido a, por ejemplo, 33°C o 35°C en las mismas células. Cuanto menor sea el valor de T, mayor es el grado de atenuación.

Región codificante estructural

[0026] La región codificante estructural del genoma del virus de la polio codifica proteínas de la cápside, que forman la cubierta proteica protectora de la partícula del virus de la polio. En el presente documento se describen virus de la polio atenuados que comprenden una o más proteínas de la cápside de la cepa de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF o Saukett, preferiblemente de la cepa de Mahoney, MEF y/o Saukett. El virus de la polio atenuado de la invención comprende todas las proteínas de la cápside de la cepa de Sabin 1, Mahoney, MEF o Saukett. El virus de la polio de la invención puede comprender proteínas de la cápside de cualquier combinación de las diferentes cepas, por ejemplo de Mahoney y MEF, de Mahoney y Saukett, de MEF y Saukett o de Mahoney, MEF y Saukett.

[0027] Las cepas recombinantes intertípicas pueden producirse mediante técnicas estándar conocidas en el sector.

Región codificante no estructural y región 3' no codificante

[0028] El virus de la polio de la invención puede tener una región codificante no estructural y una región 3' no codificante de cualquiera de las cepas de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF y Saukett.

[0029] En una realización preferida, el virus de la polio atenuado de la invención tiene una región codificante no estructural y una región 3' no codificante derivada de Sabin 3. La producción de los virus de la polio de la invención sobre una cepa con estructura de Sabin 3 mediante el intercambio de las proteínas de la cápside como un casete elimina cualquier posible efecto conocido o desconocido de recombinación, *in vitro* o *in vivo*, entre las cepas fuera de las regiones de la cápside. También hace que la construcción sea más fácil y las propiedades de los virus sean más predecible.

[0030] En una realización, el virus de la polio atenuado de la invención tiene una región codificante no estructural y una región 3' no codificante derivadas de Sabin 1 o Sabin 2, en particular cuando la región 5' no codificante deriva de Sabin 1 o Sabin 2.

Mutaciones en el gen de la proteasa 2A

[0031] Un virus de la polio atenuado de la invención puede comprender una mutación en el gen de la proteasa 2A, estando dicha mutación asociada con mayores rendimientos de las partículas inmunogénicas en líneas celulares de origen mono, tales como células Vero. Tales mutaciones se pueden obtener haciendo pasar un virus de la polio de la invención por células Vero o mediante cualquier técnica estándar mutagénica.

[0032] La mutación en el gen de la proteasa 2A es habitualmente una que es obtenible haciendo pasar un virus de la polio de la invención en células Vero. También pueden introducirse otras mutaciones en el gen de la proteasa 2A que aumentan el rendimiento del virus de la polio en líneas celulares de mono. La mutación en el gen de la proteasa 2A se puede introducir directamente mediante la mutación de un clon de virus de la polio infeccioso.

[0033] En una realización, un virus de la polio atenuado de la invención comprende una mutación en el gen de la proteasa 2A que no cambia los residuos H20, D38 o C109. En una realización preferida, la mutación del gen de la proteasa 2A del virus de la polio comprende uno de los siguientes cambios de aminoácidos: A8V, Y10C, 17CY, N18S, T19C, Y19H, L21R, T23I, E25G, A30P, I33V, W35R, K45E, G48D, E65K, E65V, Y70C, T79A, F80L, Y82H, Y93H, H96Y, S105T, P106S, I122V, V123A, G127R, V131A Y S134T.

[0034] Las mutaciones en el gen de la proteasa 2A están asociadas con una sensibilidad a la temperatura reducida y/o una mayor adaptación en líneas celulares de origen de mono, tales como las células Vero, conservando al mismo tiempo el grado de atenuación que se observa en los correspondientes virus de la polio que carecen de la mutación de la proteasa 2A.

[0035] Por lo tanto, la invención también proporciona un procedimiento para producir virus de la polio atenuados que comprenden una mutación en el gen de la proteasa 2A que comprende hacer pasar un virus de la polio de la invención por células Vero y seleccionar los virus de la polio con una mutación en el gen de la proteasa 2A asociada con mayores rendimientos de partículas inmunogénicas, implicando dicha selección:

(i) secuenciar el gen de la proteasa 2A e identificar mutaciones apropiadas; o
(ii) seleccionar los virus de la polio para identificar partículas de virus con un grado de atenuación inalterado, o sustancialmente inalterado y una sensibilidad a la temperatura reducida en comparación con los virus de la polio de la invención que no se han hecho pasar por células Vero.

[0036] Los ensayos de sensibilidad a la temperatura pueden, por ejemplo, llevarse a cabo utilizando células Vero tal como se describe en Macadam y otros, *Virology* 189: 415-22, 1992.

[0037] Las mutaciones en el gen de la proteasa 2A se pueden introducir mediante cualquiera de los procedimientos conocidos de introducción de mutaciones en el ADN tal como se describe anteriormente.

[0038] Preferiblemente, los virus de la polio de la invención que se cultivan en células no humanas, tales como células Vero, en los procedimientos de producción de IPV comprenden al menos una mutación en el gen de la proteasa 2A tal como se describe en el presente documento.

Vacunas

[0039] Los virus de la polio de la invención pueden ser utilizados a pequeña escala en actividades de vigilancia, tales como estudios de seroprevalencia y a escala masiva en la producción de IPV. Los virus de la polio de la invención requieren un mínimo de contención antes de la erradicación del virus de la polio y, no sería necesaria una contención posterior a la erradicación en la categoría NBS3-polio, tal como lo requiere la actual orientación de la OMS para cepas viables infecciosas para los seres humanos.

[0040] Los virus de la polio atenuados pueden de este modo ser utilizados como semillas (IPV). Por consiguiente, la presente invención proporciona un virus de la polio atenuado inactivado de la invención. La invención también proporciona el uso de un virus de la polio de acuerdo con la invención como una semilla de IPV.

[0041] También se proporcionan por la invención un procedimiento para preparar una vacuna contra la polio inactivada, que comprende:

- (i) hacer crecer un virus de la polio atenuado según la invención en un cultivo celular *ex vivo*;
- (ii) inactivar dicho virus de la polio; y
- (iii) formular dicho virus de la polio inactivado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0042] El virus de la polio atenuado puede cultivarse en células no humanas cultivadas, tales como células L20B y células Vero. El virus de la polio atenuado puede cultivarse en células humanas cultivadas, tales como células MRC5 y Hep2C.

[0043] El virus de la polio puede inactivarse mediante cualquier procedimiento adecuado. Habitualmente, se emplean procedimientos utilizados para inactivar los virus de la polio de tipo salvaje en las IPV que se utilizan actualmente. Por ejemplo, el virus de la polio puede inactivarse por formaldehído, β -propiolactona o tratamiento con etilenimina binaria, preferiblemente mediante tratamiento con formaldehído.

[0044] Un virus de la polio atenuado según la presente invención puede estar inactivado. Las cepas de virus de la polio atenuados inactivados de la invención se pueden combinar con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se puede emplear cualquier vehículo o diluyente convencionalmente utilizado en preparaciones de virus inactivados, tales como preparaciones de IPV. La preparación de IPV puede comprender virus de la polio inactivados que comprenden proteínas de la cápside tipo1, tipo2 y/o tipo 3.

[0045] Los virus de la polio inactivados atenuados de la invención se pueden utilizar por lo tanto para vacunar contra la poliomiелitis en un paciente humano. Por consiguiente, un procedimiento de vacunación de un sujeto contra el virus de la polio puede comprender administrar a un sujeto con necesidad de la misma una cantidad eficaz de un virus de la polio inactivado de la invención. Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune protectora contra el virus de la polio. Para este propósito, se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada, tal como por vía parenteral. La administración parenteral puede ser por inyección subcutánea, intradérmica o inyección intramuscular. Los virus de la polio inactivados de la invención se pueden administrar con un adyuvante.

[0046] Se puede administrar una dosis correspondiente a la cantidad administrada para una IPV convencional, tal como 8 a 40 unidades de antígeno D.

[0047] La dosis del virus de la polio recombinante inactivado intertípico de la invención se puede ajustar para conseguir el grado requerido de inmunogenicidad. Por ejemplo, cuando una proteína de la cápside deriva de Sabin 2 o 3 Sabin se puede utilizar una dosis más alta que cuando la proteína de la cápside deriva de Sabin 1, MEF, Mahoney o Saukett. Por ejemplo, se puede utilizar una dosis de aproximadamente 16 a aproximadamente 80 unidades de antígeno D, tal como aproximadamente 30 unidades de antígeno D (por ejemplo, 32 unidades de antígeno D) o aproximadamente 60 unidades de antígeno D (por ejemplo, 64 unidades de antígeno D). Se pueden utilizar dosis más bajas si la vacuna se administra con un adyuvante apropiado.

[0048] La presente invención proporciona una vacuna que comprende un virus de la polio inactivado de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede comprender además un adyuvante. La vacuna puede comprender una o más cepas diferentes del virus de la polio recombinante intertípico de la invención. Por ejemplo, la vacuna puede comprender una mezcla de virus que comprende proteínas estructurales de cepas del virus de la polio de tipo 1 y tipo 2, tipo 1 y tipo 3, tipo 2 y tipo 3 o tipo 1, tipo 2 y tipo 3. Habitualmente, las proteínas de la cápside de tipo 1 serán de Sabin 1 o Mahoney, preferiblemente Mahoney, la proteína de la cápside de tipo 2, de Sabin 2 o MEF, preferiblemente MEF y las proteínas de la cápside de tipo 3 de Sabin 3 o Saukett, preferiblemente Saukett.

[0049] En vista de los diferentes inmunogenicidades relativas de los virus de la polio de tipo 1, tipo 2 y tipo 3 de la invención, la vacuna puede comprender diferentes cantidades de virus de la polio que contiene proteínas de la cápside de tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3. Por ejemplo, se puede utilizar una proporción tipo 1: tipo 2: tipo 3 de x: y: z, donde $x < y < z$. En un ejemplo específico, la proporción puede ser 30:32:45 unidades de antígeno D.

[0050] El virus de la polio inactivado de la invención se puede administrar como una vacuna contra la polio independiente o en una vacuna de combinación que contiene otros componentes, tales como DTP (difteria, pertussis, tétanos), Hib (Haemophilus influenza tipo B) o la hepatitis B.

[0051] La presente invención también proporciona: el uso de un virus de la polio inactivado de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para usar en un procedimiento de vacunación contra el virus de la

polio; y un virus de la polio inactivado de acuerdo con la invención para usar en un procedimiento de vacunación contra el virus de la polio.

[0052] Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de nuevas cepas

[0053] S15, S17, S18 y S19 (Tabla 1, Figura 1) son derivados de la cepa de la vacuna contra la polio oral de tipo 3, Sabin 3. Los virus se construyeron y se recuperaron mediante procedimientos estándar. Los nucleótidos mutados se muestran en negrita en la figura 1, el resto de las secuencias son idénticas a Sabin 3. La sustitución de pares de bases CG por pares de bases UA o AU disminuye progresivamente la estabilidad termodinámica del dominio V; la eliminación de todos los pares de bases UG hace que la estructura sea genéticamente estable, ya que cualquier mutación individual debilitaría entonces el par de bases correspondiente. Se requerirían dos mutaciones simultáneas para fortalecer la estructura ya que esto sólo podría lograrse mediante el cambio de un par de bases UA a un par de bases CG (o GC).

[0054] Los virus se construyeron y recuperaron mediante procedimientos estándar. Más específicamente, S17, S18 y S19 se construyeron mediante mutagénesis por PCR. Para cada plásmido, se amplificaron tres fragmentos de la región 5' no codificante de Sabin 3 por PCR usando cebadores que incorporan los cambios de secuencia necesarios (como se muestra en la figura 1), que se encuentran 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 cebadores externos, a continuación, el fragmento de 747 pb que comprende la región 5' no codificante mutada se clonó en pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenció. Los fragmentos de MluI-SacI (279-751) con secuencias correctas se ligaron en clones de Sabin 3 que carecían del fragmento SalI-SacI (751-1900). Se generaron clones infecciosos de longitud completa mediante la adición de un fragmento parcial de SacI/SmaI (2768).

[0055] Las regiones (P1) que codifican la proteína de la cápside de S18 y S19 fueron reemplazados exactamente por las regiones P1 de las cepas de vacuna viva atenuada del serotipo 1 y serotipo 2 (Sabin 1 y Sabin 2) o por las regiones P1 de las cepas actuales de semillas de IPV de tipo salvaje Mahoney (tipo 1), MEF (tipo 2) y Saukett (tipo 3). Las secuencias de la cápside se amplificaron por PCR usando ARN de la cepa pertinente del virus de la polio como molde y cebadores que incorporan sitios de restricción SacI y SacII en los extremos 5' y 3' (figura 2) sin alterar la secuencia codificante.

[0056] Las regiones P1 de Sabin 1 y Mahoney se amplificaron utilizando los cebadores:

- SACI [5'-ATCATAATGGGAGCTCAGGTTTCA-3'] (SEQ ID NO: 3) y

**2ASAC1(-) [5'-TTGTAACCCGCGGTGTACACAGCTTTATTCTGA
TGCCCAAAGCCATATGTGGTCAGAT-3'] (SEQ ID NO: 4).**

[0057] La región P1 de Sabin 2 se amplificó con:

- SAC2a [5'-ACAATGGGCGCTCAA-3'] (SEQ ID NO: 5) y

**2ASAC2(-) [5'-TTGTAACCCGCGGTGTACACAGCTTTATTCTGA
TGCCCAAAGCCATAAGTCGTTAATC-3'] (SEQ ID NO: 6).**

[0058] La región P1 de MEF se amplificó con:

-SAC2b [5'-ACAATGGGAGCTCAA-3'] (SEQ ID NO: 7) y

**2ASACMEF(-) [5'-TTGTAACCCGCGGTGTACACAGCTTTATTC
TGATGCCCAAAGCCATAGGTTGTCAAGC-3'] (SEQ ID NO: 8).**

[0059] La región P1 de Saukett se amplificó usando los cebadores:

**S3P1 [5'-AACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGGAGCTC
AAGTATCATCCCAA-3'] (SEQ ID NO: 9) y**

2ASACSk(-) [5'-TTGTAACCCGCGGGTGTACACAGCTTTATTC

5 TGATGCCCAAAGCCGTAGGTGGTCAAAC-3'] (SEQ ID NO: 10).

[0060] Se introdujo un sitio de restricción SacII en S18 mediante mutagénesis por PCR usando los cebadores:

-2ASAC3 (+) [5'-GTGTACACCGCGGGTTACAA-3'] (SEQ ID NO: 11) y

10 -2ASAC3 (-) [5'-TTGTAACCCGCGGGTGTACAC-3'] (SEQ ID NO: 12).

[0061] Se verificaron las secuencias de los fragmentos de ADN que comprenden copias de todas las regiones P1 antes de la incorporación en plásmidos genómicos de longitud completa utilizando los sitios de restricción SacI y SacII. De este modo, se produjeron doce cepas finales (tabla 2, figura 2) que diferían en su secuencia de dominio V (tipo S18 o tipo S19) y su secuencia codificante de la proteína de la cápside (Sabin o salvaje; serotipos 1,2 o 3). Las secuencias de las regiones 5' no codificantes de todos los mutantes se confirmaron después de la extracción de RNA y RT-PCR.

[0062] Los virus fueron recuperados mediante transfección de monocapas de HEp2C con $\geq 2 \mu\text{g}$ de transcritos T7 (Van der Werf et al, Proc Natl Acad Sci USA 83: 2330-2334, 1986), seguido de incubación a 33°C durante 24-48 horas, momento en el cual el efecto citopático completo era evidente.

Ejemplo 2: Fenotipos de atenuación y la infectividad

[0063] En los últimos 15 años el uso de ratones transgénicos que expresan el receptor de virus de la polio humano para evaluar la virulencia del virus de la polio se ha establecido y validado.

[0064] La inoculación intraespinal de ratones transgénicos que expresan el receptor del virus de la polio (ratones TgPVR) es un procedimiento altamente sensible de medición de la infectividad *in vivo* ya que la replicación del virus conduce a la pérdida neuronal y signos clínicos evidentes de parálisis. Menos del diez UFP de virus de tipo salvaje es generalmente suficiente para paralizar el 50% de los ratones usando esta vía de inoculación (Chumakov et al, Dev Biol (Basel) 105: 171-177, 2001).

[0065] Los fenotipos de atenuación de las cepas de Sabin 3 mutadas y las cepas recombinantes intertípicas se determinaron mediante este procedimiento estándar. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1: Efecto del reemplazo de dominio V sobre la atenuación de fenotipos

	Ratones TgPVR PD₅₀ i.s./log₁₀ CCID₅₀
Sabin 1	2,25
Mahoney	$\leq 0,7$
S15/1	2,0
S18/1	$> 8,6$ (1/16)
Sabin 2	6,4
Sabin 3	3,6
S15	3,7
S17	7,4
S18	$> 8,4$ (0/16)
S19	$> 8,2$ (0/16)
Leon	0,7
*paralizado/total a la dosis más alta	

Tabla 2: Fenotipos de atenuación de nuevas cepas candidatas a vacunas

	Ratones TgPVR PD₅₀ i.s./log₁₀ CCID₅₀
S18/S1P1	$> 8,25$ (0/8)*
S18/MahP1	$> 8,3$ (0/8)
S19/S1P1	$> 8,15$ (0/8)
S19/MahP1	$> 8,10$ (0/8)
S18/S2P1	$> 8,0$ (0/8)
S18/MEFP1	$> 8,2$ (0/8)
S19/S2P1	$> 8,15$ (0/8)

S19/MEFP1 > 8,25 (0/8)

S18 > 8,4 (0/16)

S18/SktP1 > 8,15 (0/8)

S19 > 8,2 (0/16)

S19/SktP1 > 8,45 (0/8)

*paralizado/total a la dosis más alta

[0066] Utilizando la ruta intraespinal altamente sensible menos de 10 unidades infecciosas de cultivo celular de cepas de tipo salvaje Mahoney y Leon eran suficientes para paralizar la mitad de los ratones (Tabla 1). La cepa S15 era indistinguible de Sabin 3, tal como se observa en la prueba de mono (Macadam et al, 2006), y todos los virus derivados de S18 tenían PD₅₀ en exceso 10⁸ CCID₅₀ (Tablas 1 y 2). Esto son probablemente subestimaciones, ya que representan el máximo título viable en la dosis inoculada, que es 5 µl. El efecto de 3 intercambios de pares de bases CG-UA en los virus derivados de S19, por extrapolación, es probable que esté en exceso de una reducción de un billón de veces en la infectividad en este modelo. Estos resultados sugieren que los virus basados en S18 y S19 serían sustancialmente menos infecciosos para los seres humanos que Sabin 3, que tiene una baja infectividad a menos que revierta en el dominio V (que estas cepas no pueden).

Ejemplo 3: Estabilidad en el pasaje

[0067] Para evaluar la estabilidad, los virus se pasaron a 37°C en células L20B en condiciones que seleccionan rápidamente la reversión en el dominio V de Sabin 3, que imitan la selección en el intestino humano. En estas condiciones las secuencias del dominio V de S15 y S16 (fenotípicamente similar a S15) eran completamente estables (Macadam et al, 2006). Los virus derivados de S18 y S19 también fueron estables en el paso y tienen la ventaja de mutaciones pareadas no revertibles adicionales. Lo mismo ocurrió en células Vero, pero la selección de reversión en el dominio V de Sabin 3 se produjo a un ritmo más lento.

[0068] Todos los virus Vero seleccionados tenían una mutación en el gen de la proteasa 2A y crecieron a temperaturas más altas que sus parentales, hasta un grado limitado. Este fenómeno representa una adaptación a células de mono y no se observa en células de origen humano o de ratón. Estas mutaciones no parecen tener efecto sobre fenotipos *in vivo* (Tabla 3). Las PD₅₀ de uno de los virus después de 10 pases en células Vero a 37°C, y tres de las placas seleccionadas a 37°C eran indistinguibles de las de su parental, S18. Del mismo modo, la presencia de la mutación N18S en 2A no tuvo efecto sobre la atenuación de los fenotipos de las cepas S19-IPV con cápsidas de tipo salvaje (Tabla 4). A la dosis más alta administrada por vía intraespinal no hubo enfermedad clínica en ninguno de los ratones. Un resultado similar se obtuvo anteriormente en el modelo de mono de la poliomiélitis. Dos mutaciones 2A diferentes que suprimieron el fenotipo sensible a la temperatura de Sabin 2, causada por la mutación atenuante en 481 en el dominio V, no afectaron a la atenuación (Rowe et al.; Virology 269: 284-293, 2000).

Tabla 3: Fenotipos de atenuación de mutantes S18 2A *in vivo*

	Ratones TgPVR PD₅₀ i.s./log₁₀ CCID₅₀
S18	> 8,4 (0/8)*
S18 p10V	> 8,2 (0/8)*
S18/2A-V123A	> 7,9 (0/8)*
S18/2A-G127R	> 7,9 (0/8)*
S18/2A-Y82H	> 7,8 (0/8)*

*paralizado/total a la dosis más alta

Tabla 4: Fenotipos de atenuación de mutantes de S 19 2A^{pro}

	Ratones TgPVR PD₅₀ i.s./log₁₀ CCID₅₀
S19/ MahP1/2A-N18S	> 7,7 (0/8)*
S19/MEFP1/2A-N18S	> 7,9 (0/8)*
S19/MEF2P1/2A-N18S	> 7,5 (0/8)*
S19/SktP1/2A-N18S	> 7,0 (0/8)*

*paralizado/total a la dosis más alta

Ejemplo 4: Propiedades de crecimiento en cultivo celular

[0069] En el cultivo de células, el debilitamiento progresivo de la estructura secundaria de ARN del dominio V disminuyó progresivamente el límite superior de temperaturas a las que el virus era capaz de replicarse (Figura 3). Los límites reales dependían del sustrato celular utilizado, siendo las células Hep2C las más permisivas, las células L20B las que menos y las células Vero en valores intermedios. Las células MRC5 también son intermedias, pero más permisivas que las células Vero.

[0070] La cinética de crecimiento y rendimiento de todas las cepas fue similar en células MRC5 a 33°C, produciendo rendimientos tan altos como los virus de tipo salvaje (10^8 - 10^9 TCID₅₀/ml) en 24 horas (Figura 4). Las células MRC5 se validan y autorizan para la producción de IPV, aunque no muchos fabricantes los usan, prefiriendo el cultivo de células Vero sin suero sobre microportadores. Los rendimientos iniciales en células Vero fueron variables, dependiendo de la fuente y el nivel de paso de las células, pero fueron rutinariamente menores que en células MRC5. Hasta ahora, se han obtenido títulos de 2×10^9 /ml a las 24 horas para los virus S18 y 5×10^7 /ml para virus S19. Sin embargo; nuestra evidencia preliminar (a continuación) sugiere que se pueden obtener rendimientos de antígeno D en células Vero equivalentes a los obtenidos con las semillas de tipo salvaje actuales.

Ejemplo 5: Inmunogenicidad

[0071] Los dos ensayos de liberación por lotes estándar para los productos IPV son la prueba ELISA con antígeno D y la prueba de inmunogenicidad de rata (Farmacopea Europea-suplemento de 2001 2000:0214 1289-1293). La prueba ELISA utiliza anticuerpos específicos para viriones de polio nativos para medir la antigenicidad y, a continuación, la potencia se expresa por comparación con una preparación estándar. Para las pruebas in vivo las ratas se inmunizan con cuatro diluciones de la vacuna y sus sueros se prueban para conocer la presencia de anticuerpos neutralizantes. La potencia de la vacuna se calcula mediante comparación estadística de las tasas de seroconversión para los preparados de prueba con los obtenidos con una preparación estándar. Estas pruebas se han empleado para evaluar la inmunogenicidad de las nuevas cepas descritas en este documento.

[0072] Para todos los virus de la lista en la Tabla 5, se prepararon las poblaciones de títulos elevados de virus y se inactivaron con formaldehído usando el protocolo del fabricante a escala reducida (Martin et al, J. Gen. Vir. 84: 1781-1788, 2003). Los ELISA de antígeno D se llevaron a cabo sobre material antes y después de la inactivación. Estos datos se utilizaron para calcular las dosis apropiadas para las pruebas in vivo que se llevaron a cabo utilizando los procedimientos normalizados de trabajo para la liberación por lotes de vacunas. Las vacunas pasan la prueba de las ratas si los límites de confianza del 95% de la potencia incluyen el valor 1,0; de este modo, todas las construcciones con cápsides de tipo salvaje (y S18/S1P1) eran suficientemente inmunogénicas para liberarse como IPV.

[0073] El virus de la polio MEF-1 fue aislado en 1942 y contenía al menos dos componentes estrechamente relacionados; las cepas MEF-1 utilizadas actualmente por los fabricantes de IPV también difieren en varias posiciones de nucleótidos (Odoom, JK; Tesis Doctoral, London School of Hygiene and Tropical Medicine, 2008). Se encontró que la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus de S18/MEFP1 difería de la cepa de referencia de potencia de IPV en una posición, por lo que se construyó otra versión S18/MEF2P1 que tenía la misma secuencia de aminoácidos de la cápside que la referencia. En las pruebas de inmunogenicidad de rata S18/MEF2P1 era indistinguible de la cepa de referencia con una potencia relativa de 1,0 (Tabla 4), mientras que el virus S18/MEFP1 tenía una potencia ligeramente inferior. Ambas cepas fueron lo suficientemente potentes como para pasar una prueba de liberación de lotes de vacuna (CI debe incluir un valor de 1,0), pero las cepas con secuencias de la proteína de la cápside MEF2P1 es probable que sean preferibles para la producción de vacunas.

Tabla 5: Antigenicidad e inmunogenicidad de nuevas cepas

	CCID ₅₀ /unidad de D Ag pre- inactivación (log ₁₀)	Rendimiento de D Ag tras la inactivación (%)	CCID ₅₀ /unidad de D Ag post- inactivación (log ₁₀)	Potencia relativa in vivo (95% CI)
S18/S1P1	5,6	6	6,8	1,5 (0,8-3,0)
S18/MahP1	6,0	11	7,0	1,2 (0,6-2,3)
S18/S2P1	7,0	90	7,1	0,1 (0,04-0,2)
S18/MEFP1*	7,0	91	7,1	0,5 (0,2-1,0)
S18/MEF2P1*			7,3	1,0 (0,4-2,4)
Sabin 3	6,9	38	7,3	0,4 (0,2-0,9)
S18	6,7	23	7,3	0,3 (0,1-0,7)
S18/SktP1	6,8	90	6,9	1,6 (0,8-3,3)

*S18/MEFP1 contiene una diferencia de un único aminoácido en la región proteica de la cápside en comparación con la cepa MEF utilizada para hacer la IPV de referencia; S18/MEF2P1 es idéntica en la región proteica de la cápside a la cepa MEF utilizada para hacer la IPV de referencia.

[0074] Tras el análisis estadístico, los resultados mostraron:

- Las alteraciones introducidas en el dominio V no tenían ninguna influencia sobre la inactivación, la antigenicidad o inmunogenicidad.
- Los rendimientos de inmunógeno en términos de DAgU/título infeccioso inicial estuvieron en línea con los datos del fabricante.
- Las cepas con proteínas de la cápside de tipo salvaje eran aproximadamente tan inmunogénicas como la cepa de IPV equivalente.
- En comparación con la cepa de referencia de tipo salvaje pertinente, las cepas con proteínas de la cápside de

Sabin fueron ligeramente más inmunogénicas (tipo 1), y mucho menos inmunogénicas (tipo 2) y un poco menos inmunogénicas (tipo 3).

Ejemplo 6: Crecimiento y Estabilidad en células Vero

[0075] Cuando las cepas S18 y S19 de los virus de la polio se cultivan en células Vero, su replicación inicial es bastante lenta. Los virus de la polio con mutaciones particulares en el gen de la proteasa 2A crecen más eficientemente en células Vero. Cuando se cultivan muchos virus de la polio en células Vero, se adaptan para el crecimiento en este tipo de células, y son las mutaciones en el gen de la proteasa 2A las responsables de la mayor eficiencia de crecimiento. Las versiones de las cepas S18 y S19 que tienen una modificación adecuada introducida en el gen de 2A (por ejemplo, la mutación N18S) no requieren la etapa de adaptación y se replican eficazmente en células Vero desde el principio.

[0076] El efecto de una mutación V123A en el gen de la proteasa 2A de Sabin 3, S18 y S19 sobre el crecimiento en células Vero se demostró mediante la infección de células Vero a una multiplicidad de infección de 1,0 e incubando las células durante 48 h a 33°C. Los rendimientos se midieron mediante una prueba de CCID₅₀ en células Hep2C a 33°C. Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Efecto de las mutaciones 2A sobre el rendimiento* en células Vero

	log ₁₀ CCID ₅₀ /ml	+ 2A-V123A
Sabin 3	8,5	8,7
S18	7,8	8,6
S19	7,2	8,3

[0077] El virus S18/MahP1 y un virus equivalente con una mutación introducida en el gen 2A, S18/MahP1/2AN18S, se cultivaron en células Vero a tres temperaturas diferentes durante 10 pases para determinar la estabilidad de la secuencia del gen de la proteasa 2A y de la secuencia del dominio V. Como se muestra en la Tabla 7 a continuación, la secuencia del dominio V y la secuencia del gen de proteasa 2A mutada en N18S eran completamente estables. La secuencia del gen de la proteasa 2A no mutada recogió mutaciones que facilitan el crecimiento en células Vero, tal como se esperaba.

Tabla 7: Estabilidad de secuencia tras 10 pases en células Vero

	Temperatura del pase	Secuencia de dominio V	Secuencia de 2A ^{pro}
S18/MahP1	33°C	Sin cambios	Mutaciones seleccionadas*
	35 °C	Sin cambios	Mutaciones seleccionadas*
	37 °C	Sin cambios	Mutaciones seleccionadas*
S18/MahP1/2A N18S	33 °C	Sin cambios	Sin cambios
	35 °C	Sin cambios	Sin cambios
	37 °C	Sin cambios	Sin cambios

*L17R, N18S, L21R, P90S, S10S, S105T o D138N

LISTADO DE SECUENCIAS

[0078]

<110> HEALTH PROTECTION AGENCY
 <120> Vacuna inactivada contra la poliomielitis
 <130> N.112744A
 <150> GB 1022077.0
 <151> 2010-12-29
 <160> 15
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> dominio V modificado de la cepa del virus de la polio Sabin 3 - S18
 <400> 1

auucuaacua uuaagcagggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguua cgcgcaaguu

aauagcgaaa

<210> 2
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> dominio V modificado de la cepa del virus de la polio Sabin 3 - S19
 <400> 2
 auucuaaaaua uuaagcagggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguua cgcgcaaguu 60
 10 aaauaucgaaa 70

 <210> 3
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 20 atcataatgg gagctcaggt ttca 24
 <210> 4
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 4
 ttgtaaccgg cgggtgtacac agctttattc tgatgcccaa agccatatgt ggtcagat 58
 <210> 5
 30 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <900> 5
 acaatgggag ctcaa 15
 <210> 6
 <211> 58
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 ttgtaaccgg cgggtgtacac agctttattc tgatgcccaa agccataagt cgtaaatc 58
 45 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 7
 acaatgggag ctcaa 15
 <210> 8
 <211> 58
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 60 ttgtaaccgg cgggtgtacac agctttattc tgatgcccaa agccataggt tgtcaagc 58
 <210> 9
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador

ES 2 574 178 T3

<400> 9
 aactgcggcc cagccggcca tggccggagc tcaagtatca tcccaa 46
 <210> 10
 <211> 58
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 10
 10 ttgtaaccg cggtgtacac agctttattc tgatgccaa agccgtaggt ggtcaaac 58
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
 gtgtacaccg cgggttaca 20
 <210> 12
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 12
 ttgtaaccg cggtgtacac 20
 <210> 13
 <211> 70
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> dominio V de la cepa del virus de la polio Sabin 3
 <400> 13
 35 **auucuaacca uggagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguua cgcgcaaguc** 60
cguggcggaa 70
 <210> 14
 40 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> dominio V modificado de la cepa del virus de la polio Sabin 3 - S15
 45 <400> 14
auucuaacca uugagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguua cgcgcaaguc 60
aauggcgaaa 70
 50 <210> 15
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> dominio V modificado de la cepa del virus de la polio Sabin 3 - S17
 <400> 15
 60 **auucuaacua uugagcaggc agcugcaacc cagcagccag ccugucguua cgcgcaaguc** 60
aauggcgaaa 70

REIVINDICACIONES

1. Virus de la polio recombinante atenuado que tiene:
 - (i) una región 5' no codificante que consiste en la región 5' no codificante de Sabin 3, modificada de manera que no tiene un desajuste de pares de bases en el tallo (a) o (b) del dominio V, en que:
 - (a) un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (a) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 479-532 y 482-529 en el tallo (b); o
 - (b) un par de bases U-A está presente en las posiciones 471-538 y 472-537 en el tallo (A) y en las posiciones 478-533, 480-531 y 481-530 en el tallo (b) y un par de bases A-U está presente en las posiciones 477-534, 479-532 y 482-529 en el tallo (b);
 - y
 - (ii) una región codificante de la cápside P1 de la cepa Sabin 1, Mahoney, MEF o Saukett.
2. Virus de la polio, según la reivindicación 1, que tiene una región codificante no estructural y una región 3' no codificante derivadas de Sabin 3.
3. Virus de la polio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una mutación en el gen de la proteasa 2A, estando dicha mutación asociada con mayores rendimientos de partículas inmunogénicas en células de origen de mono.
4. Virus de la polio, según la reivindicación 3, en el que dicha mutación en el gen de la proteasa 2A es obtenible mediante el pase de un virus de la polio, según la reivindicación 1 ó 2, en células Vero.
5. Virus de la polio, según la reivindicación 3 ó 4, en el que la mutación no cambia los residuos H20, D38 o C109.
6. Virus de la polio, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la mutación es cualquiera de los siguientes cambios de aminoácidos: A8V, Y10C, 17CY, N18S, T19C, Y19H, T23I, E25G, A30P, I33V, W35R, K45E, G48D, E65K, E65V, Y70C, T79A, F80L, Y82H, Y93H, H96Y, S105T, P106S, I122V, V123A, G127R, V131A Y S134T.
7. Virus de la polio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está inactivado.
8. Virus de la polio, según la reivindicación 7, para usar en una vacuna.
9. Vacuna que comprende un virus de la polio, según la reivindicación 7, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
10. Utilización de un virus de la polio, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como semilla de una vacuna contra la polio inactivada (IPV).
11. Procedimiento para la preparación de una vacuna contra la polio inactivada, que comprende:
 - (i) crecer un virus de la polio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un cultivo celular *ex vivo*;
 - (ii) inactivar dicho virus de la polio; y
 - (iii) formular dicho virus de la polio inactivado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que el virus de la polio crece en células no humanas.
13. Utilización de un virus de la polio, según la reivindicación 7, en la fabricación de un medicamento para usar en un procedimiento de vacunación contra el virus de la polio.
14. Virus de la polio, según la reivindicación 7, para usar en un procedimiento de vacunación contra el virus de la polio.

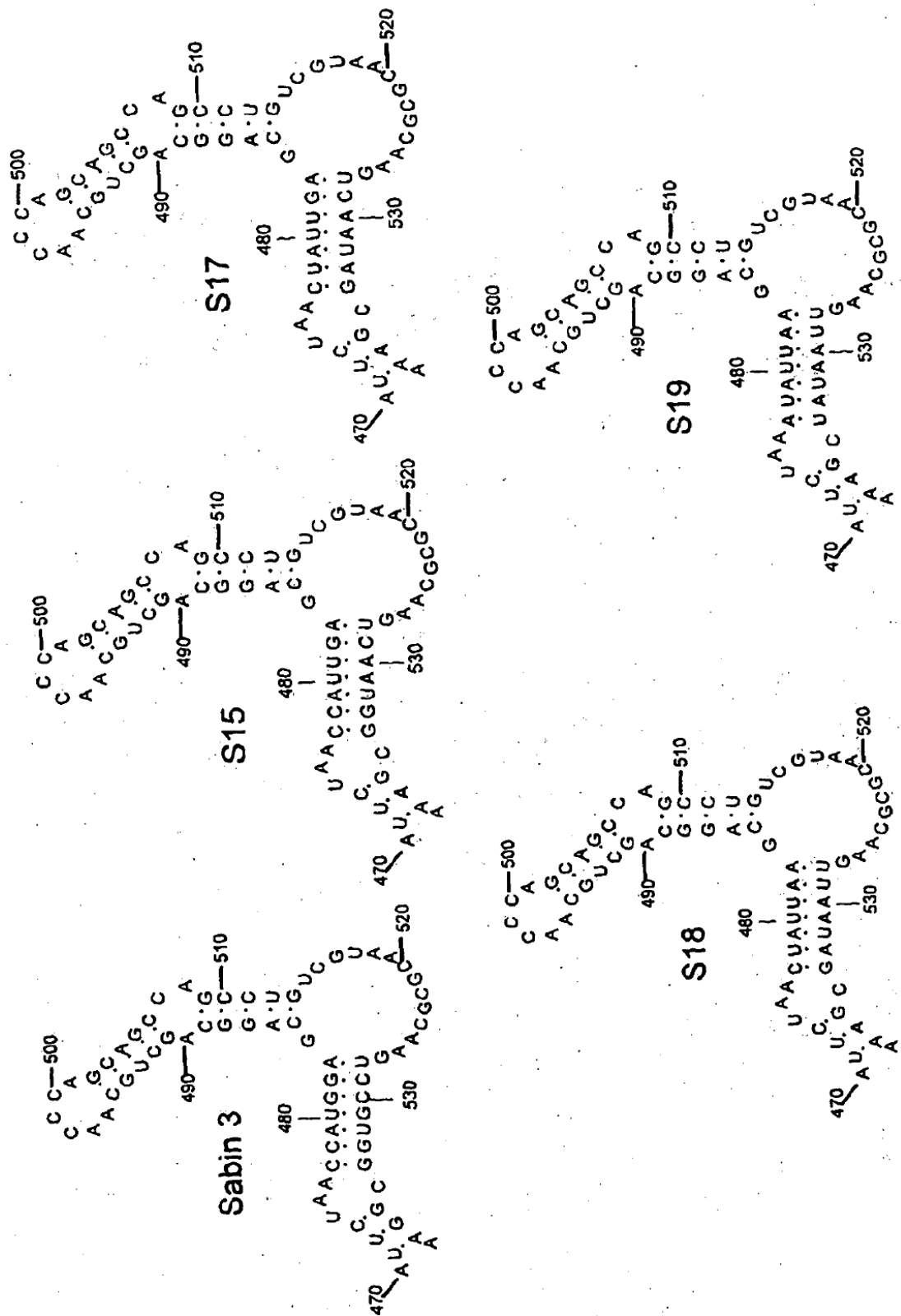


Figura 1

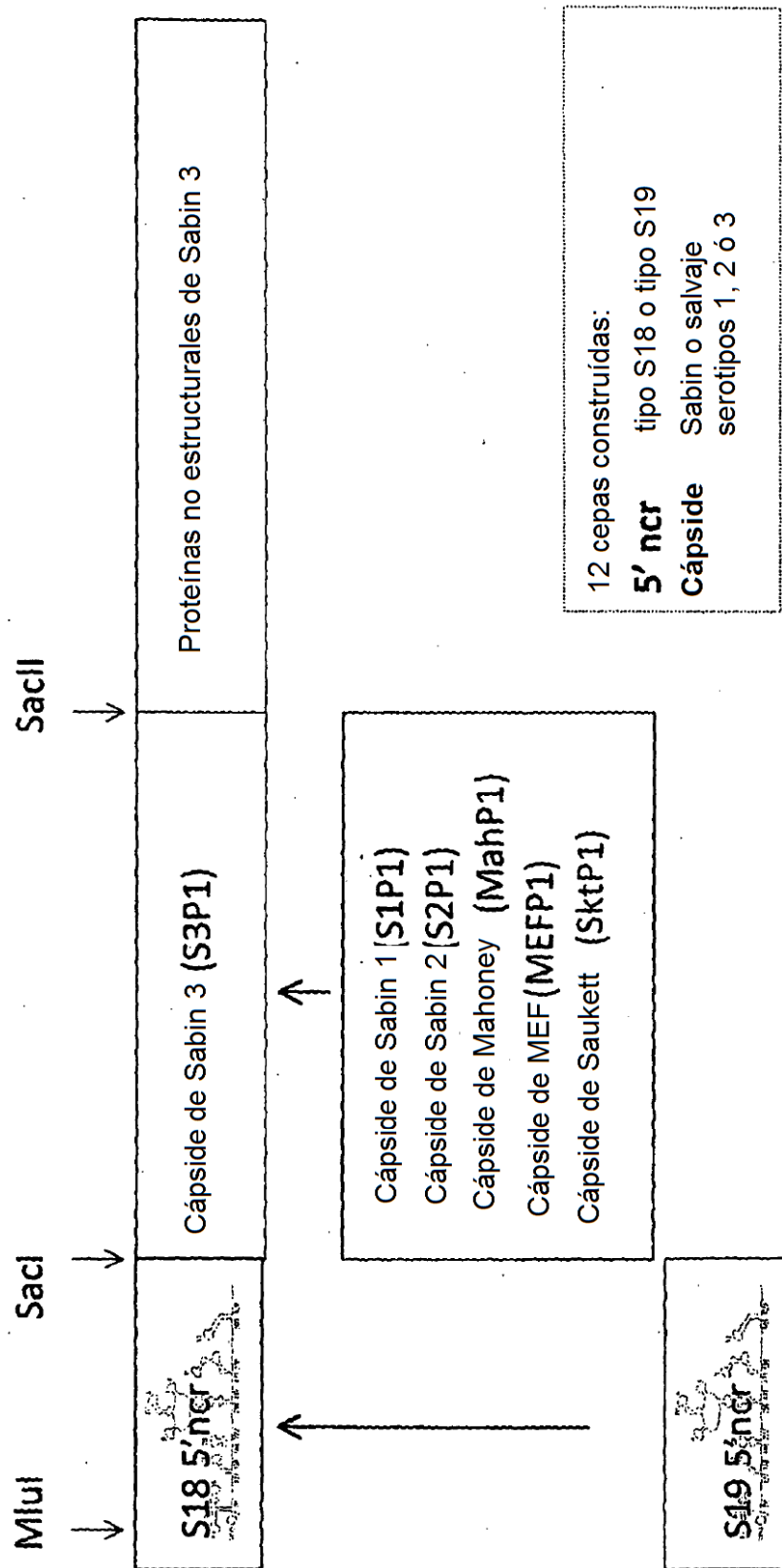


Figura 2

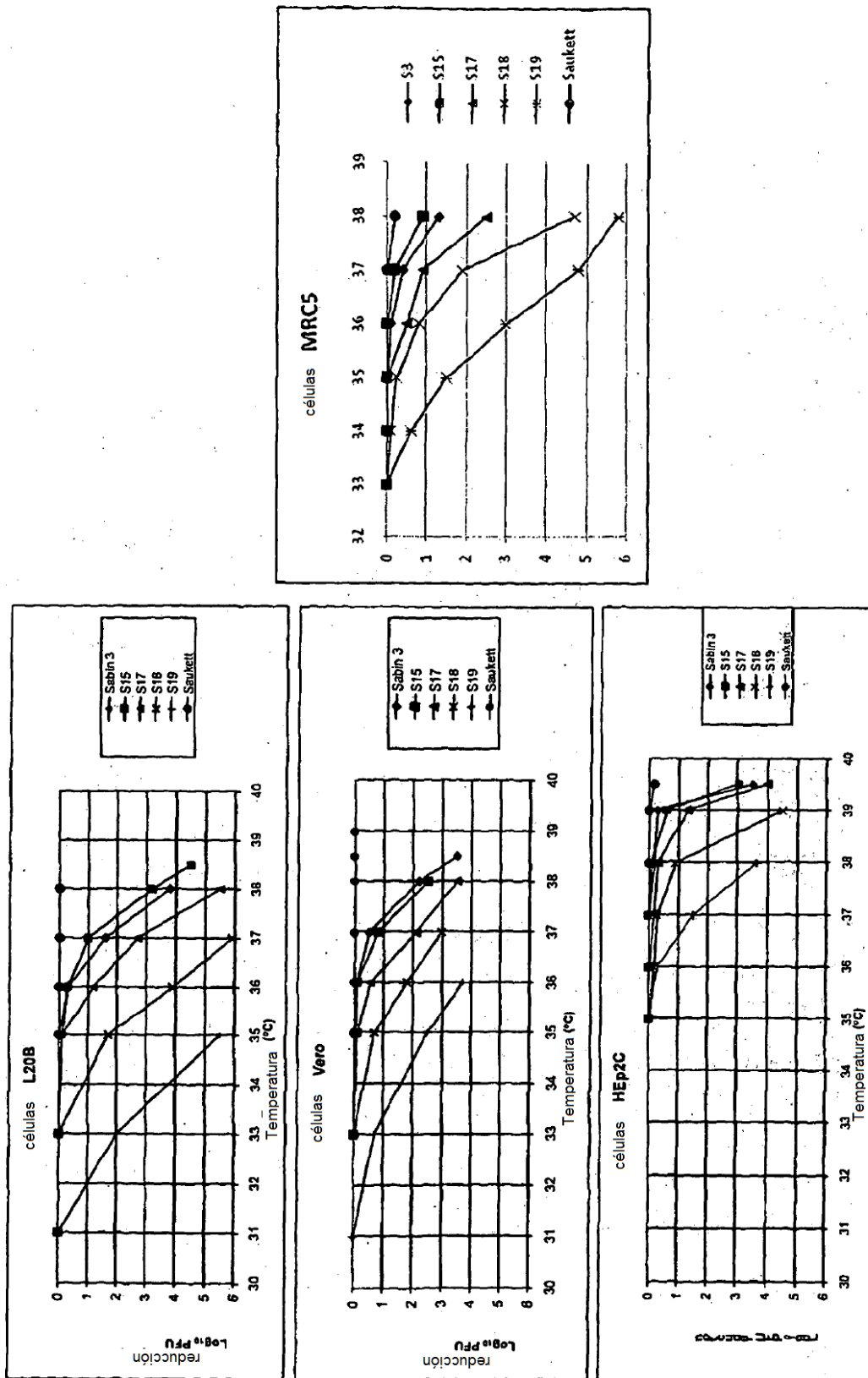


Figura 3

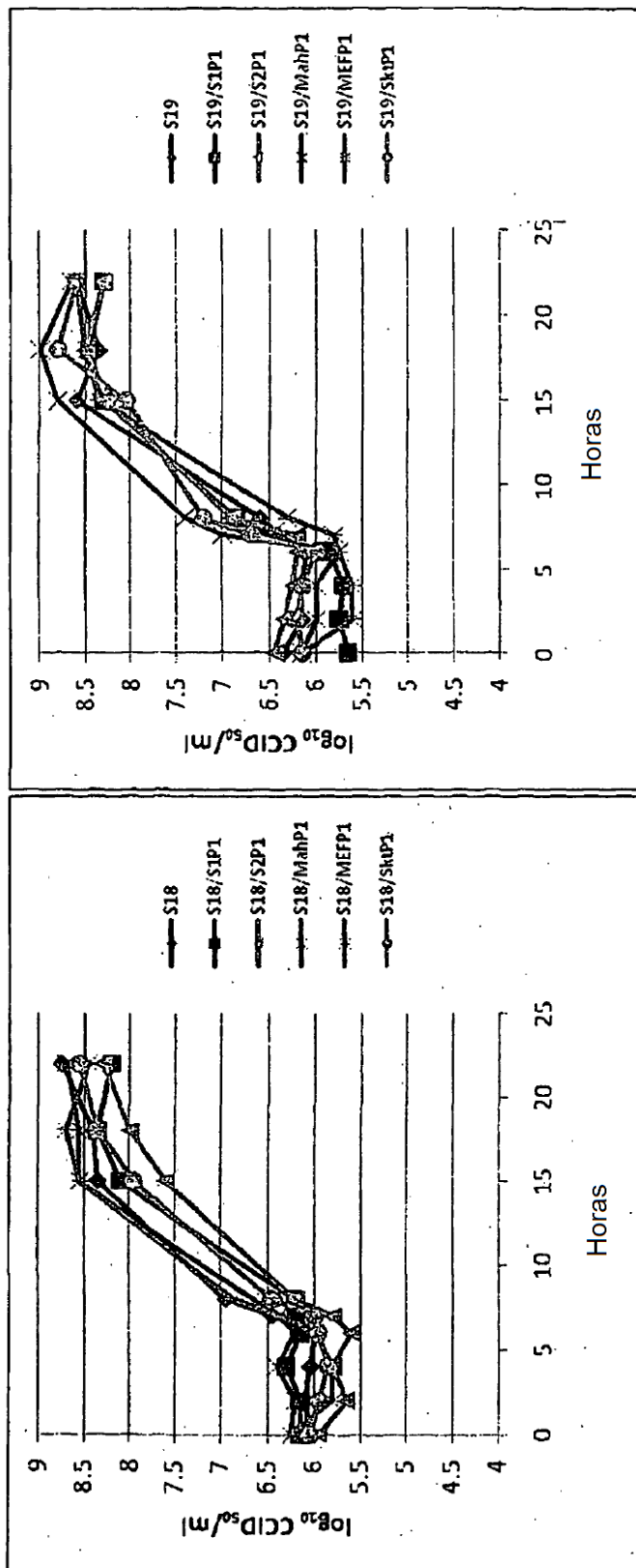


Figura 4