

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 113**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2012 PCT/JP2012/000838**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12108195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2012 E 12744339 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2674491**

54 Título: **Método para producir un vector viral para la transferencia génica**

30 Prioridad:

08.02.2011 JP 2011025234

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2017

73 Titular/es:

**MIE UNIVERSITY (50.0%)
1577, Kurimamachiya-cho
Tsu-shi, Mie 514-8507, JP y
BIOCOMO INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FUKUMURA, MASAYUKI;
KAWANO, MITSUO;
NOSAKA, TETSUYA y
OHTSUKA, JUNPEI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 640 113 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

Método para producir un vector viral para la transferencia génica

5 **Campo técnico****Solicitud relacionada**

10 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud de Patente Japonesa N.º 2011-025234 presentada el 8 de febrero de 2011, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia.

Campo técnico

15 La presente invención se refiere a un método para producir un vector viral para la transferencia génica.

Antecedentes de la técnica

20 El virus paragripal humano de tipo 2 (hPIV2) infecta la mucosa respiratoria humana y puede inducir inmunidad en la mucosa, por lo que se espera encontrar una aplicación como un vector de vacuna. Con el fin de llevar a la práctica este vector, se requiere que el vector viral tenga la capacidad de infectar células humanas y no generar virus transmisibles en el cuerpo humano después de la infección (dicho vector se denomina vector no proliferativo). Por lo tanto, se requiere un sistema que pueda infectar primariamente células o tejidos, pero que no produzca virus transmisibles en las células o tejidos infectados de modo que no provoque infecciones recurrentes. El procedimiento para la construcción de un sistema de este tipo generalmente incluye la supresión parcial de un gen en un genoma viral, la preparación de células que expresan un producto codificado por el gen deleciónado y la complementación *in trans* del virus defectuoso en las células con el producto codificado por el gen eliminado para preparar un vector no proliferativo. Este sistema se ha introducido en virus de ADN tales como adenovirus (por ej., documento WO 94/28152) y virus de ARN tales como retrovirus (por ej., documento WO 2006/084746). Para los virus de la familia *Paramyxoviridae* a la que pertenece el virus paragripal humano de tipo 2, se ha propuesto un vector viral Sendai defectuoso en el gen F y similares (documento WO 2000/070070). También se ha descrito que una vacuna para la prevención de la aparición de la tuberculosis, que utiliza un vector recombinante no proliferativo derivado del virus paragripal humano de tipo 2 mediante la incorporación de un gen de antígeno α (Ag85B) de micobacterias típicas tales como *Mycobacterium kansasii* o *Mycobacterium bovis* BCG (PCT/JP 2010/069435), tiene un alto efecto supresor de la proliferación de *Mycobacterium tuberculosis*.

35 El virus paragripal humano de tipo 2 con deficiencia del gen F no contiene, por sí mismo, la proteína de Fusión (denominada en lo sucesivo "proteína F") del virus paragripal humano de tipo 2 que se requiere durante la replicación viral y la transcripción después de la invasión en una célula hospedadora y gracias a la cual se fusiona la envoltura viral con la membrana celular introduciendo una nucleocápside viral en la célula hospedadora de modo que no se pueden formar partículas virales competentes para la replicación. Por lo tanto, la preparación de un vector del virus paragripal humano de tipo 2 no proliferativo que sea defectuoso del gen F en el genoma pero que contenga la proteína F en una envoltura vectorial incluye generar células que expresen la proteína F del virus, cultivar el virus defectuoso en las células con el fin de retener la proteína F en la envoltura viral en presencia de la proteína F complementada *in trans* por las células y con ello la construcción de partículas virales infecciosas. Las partículas de virus paragripal humano de tipo 2 recogidas del sobrenadante del cultivo preparado de acuerdo con el sistema de replicación anterior contienen un genoma que carece del gen F. La incorporación de genes terapéuticos o genes que codifican antígenos vacunales en el vector del virus paragripal humano de tipo 2 defectuoso del gen F puede proporcionar partículas virales útiles como medicamentos.

50 Debido a que los virus incluyen generalmente proteínas de membrana que son citotóxicas, ha sido convencionalmente necesario suprimir la expresión del gen F viral y similares en tiempos normales estableciendo una línea celular después de introducir un vector que está diseñado para expresar el gen F y similares bajo el control de un promotor inducible e inducir la expresión del gen F y similares solo cuando el virus se reconstituye después de infectar células cooperadoras que expresan el gen F y similares. En el documento anterior relativo al vector del virus Sendai (documento WO 2000/070070), por ejemplo, se utiliza un sistema en el que el gen F del virus Sendai no se expresa durante la proliferación de células hospedadoras utilizando el sistema inducible Cre-loxP y su expresión se induce tras la infección del virus en las células por adición de un adenovirus.

60 Sin embargo, la etapa de preparación y adición de adenovirus hace que la producción comercial del vector viral sea complicada. También existe el problema de que la etapa de control de la fabricación del medicamento se complica porque la eficacia de introducción del gen por un adenovirus no es constante. Además, existe el problema de que durante la producción real del vector viral con el sistema inducible de expresión de la proteína de membrana cultivando células y replicando partículas virales, la capacidad de replicación viral disminuye con un aumento en el número de pasajes de las células hospedadoras debido a la toxicidad de la proteína de membrana expresada, de manera que las células pierden la capacidad de producción del virus después de aproximadamente 5 pasajes.

Por lo tanto, existe la necesidad de obtener como una célula que pueda expresar un gen que codifica una proteína de membrana y similares que es defectuosa en un virus y que permite la replicación del vector viral defectuoso, un sistema celular que pueda expresar constitutivamente y de forma estable la proteína. También existe la necesidad de un sistema de célula hospedadora que tenga tal robustez que sus propiedades sean estables después del subcultivo.

A continuación se muestran las referencias citadas en la presente memoria descriptiva. Los contenidos de estas referencias se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Sin embargo, no pretende admitir que cualquiera de estas referencias esté disponible como "técnica anterior" a la presente memoria descriptiva.

Documento de patente 1: WO 94/28152
 Documento de patente 2: WO 2006/084746
 Documento de patente 3: WO 2000/070070
 Documento de patente 4: PCT/JP 2010/069435

Divulgación de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar, como una célula para la proliferación de un virus deficiente en el gen F del virus paragripal humano de tipo 2, un sistema celular que pueda expresar constitutivamente y de manera estable la proteína F del virus paragripal humano de tipo 2 y proporcionar un método para producir un virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F utilizando la célula.

Los presentes inventores han encontrado que las células Vero tienen excelentes propiedades para ser utilizadas como células empaquetadoras que pueden infectarse con un virus deficiente en el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 y producir partículas virales. Se ha encontrado sorprendentemente que las células Vero tienen una alta tolerancia a la proteína F del virus paragripal humano de tipo 2, no expresan interferones, pueden proliferar de forma estable bajo la expresión constitutiva del gen F del virus paragripal humano de tipo 2 y pueden producir partículas virales eficazmente.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para producir un vector de virus paragripal humano de tipo 2 no proliferativo. El método incluye las etapas de co-cultivar un virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F con una célula Vero que tiene el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 de tal manera que el gen F se expresa no induciblemente y aislar las partículas virales de un sobrenadante de cultivo.

En una realización preferida del método de la presente invención, el virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F tiene un gen en el que se ha incorporado una vacuna o un gen terapéutico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula Vero que tiene el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 de tal manera que el gen F se expresa no induciblemente.

El método de la presente invención permite la producción efectiva y estable de vectores virus paragripal humano de tipo 2 no proliferativos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una estructura de una partícula y un genoma de virus paragripal humano de tipo 2.
 La Figura 2 es la confirmación de la expresión del gen F en células Vero que expresan el gen F después de un cultivo prolongado (aproximadamente un año) que muestra la retención de la expresión del gen F.
 La Figura 3 muestra una transferencia Western que confirma la expresión de la proteína F en células Vero introducidas en el gen F.
 La Figura 4 muestra una estructura parcial de un plásmido que contiene un ADNc genómico antisentido de un virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F y el gen GFP y.
 La Figura 5 muestra una transferencia Western que confirma la expresión de la proteína M2 por un hPIV2 deficiente en el gen F que alberga el gen M2.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un método para replicar un virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F usando células Vero que tienen el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 de tal manera que el gen F se expresa no induciblemente.

El virus paragripal humano de tipo 2 pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y tiene un genoma que es un ARN negativo monocistrónico de cadena sencilla de aproximadamente 15.000 bases. La Fig. 1 muestra la estructura de la partícula fundamental del virus paragripal humano de tipo 2 (hPIV2). El ácido nucleico se une a una proteína de la nucleocápside (NP) para formar un complejo ribonucleósido-proteína helicoidalmente simétrico (nucleocápside, RNP). Entre las proteínas codificadas por el genoma viral, la proteína NP, la proteína P (fosfo) y la proteína L

(grande) son necesarias para la formación de la RNP. La proteína F (fusión) y la proteína HN (hemaglutinina-neuraminidasa) son proteínas de la envoltura e importantes para la infección celular. La proteína M (matriz) es una proteína de membrana que soporta la estructura de la envoltura.

5 El virus paragripal humano de tipo 2 es un virus de ARN que se replica en el citoplasma de las células infectadas y, por lo tanto, el gen del virus no se incorpora en los cromosomas de las células hospedadoras. Basándose en los hechos de que se sabe que el virus infecta la mucosa respiratoria humana e induce inmunidad a la mucosa por expresión inducible de la IgA y de que no hasta la fecha no se han descrito casos de infección grave en adultos, se cree que el virus es significativamente útil como una vacuna o vector viral terapéutico.

10 El virus paragripal humano de tipo 2 modificado para expresar las proteínas NP, P y L pero no la proteína F puede infectar principalmente una célula; sin embargo, no puede producir partículas virales infecciosas en la célula. Por lo tanto, tiene la ventaja de que es altamente seguro como vector terapéutico o vacunal.

15 La célula Vero que expresa la proteína F del virus paragripal humano de tipo 2 de la presente invención es una célula hospedadora útil para la producción de partículas virales deficientes en el gen F mediante la replicación del virus deficiente en el gen F del genoma viral.

20 Las "células Vero" son células cultivadas derivadas del epitelio renal del mono verde africano que se caracterizan por la ausencia de producción de interferón y constituyen una línea celular que es ampliamente utilizada en todo el mundo principalmente para estudios de infección de virus y producción de vacunas. En la presente invención, pueden usarse células Vero comercialmente disponibles.

25 El "gen F" es un gen que codifica la proteína F del virus paragripal humano de tipo 2. Este término se utiliza en la presente memoria para referirse no solo al ARN genómico viral, sino también al ADN y al ARN que tienen secuencias correspondientes o secuencias complementarias de los mismos.

30 El término "se expresa no induciblemente" significa que la expresión está diseñada para proceder sin requerir un sistema de expresión inducible y que la expresión prosigue sin ninguna operación de inducción. El sistema de expresión inducible se refiere a un sistema basado en una combinación de célula hospedadora/vector y condiciones de cultivo que están diseñadas de manera que no permitan la expresión sin una operación de inducción o con una operación de supresión sino que permitan la expresión solo con la operación de inducción o con eliminación de la operación de supresión. En la técnica se conocen muchos sistemas de expresión inducibles. Expresión no inducible significa expresión que procede sin una operación de inducción o eliminación de una operación de supresión. La expresión no inducible es generalmente expresión constitutiva. Sin embargo, la expresión "no inducible", tal como se utiliza en la presente memoria, también incluye la expresión que puede suprimirse en una fase particular durante la división celular o el ciclo celular y la expresión que puede suprimirse de acuerdo con las condiciones de cultivo, tales como temperatura de cultivo, composición de un medio o densidad celular.

40 La célula Vero que expresa la proteína F de la presente invención se produce de la siguiente manera: primero se prepara un vector plasmídico recombinante que tiene el gen F y un marcador (por ejemplo resistencia a fármacos) y se utiliza para la transfección de células Vero. La secuencia del gen F es ya conocida, de manera que el vector plasmídico recombinante se puede producir fácilmente incorporando el gen F en un vector plasmídico apropiado comercializado.

45 La transfección se puede realizar de acuerdo con un método convencional usando diversos reactivos de transfección comercializados o por electroporación. A continuación, los transformantes se identifican utilizando el marcador, los cuales se aíslan y se someten a expansión celular. La expresión de la proteína F en las células Vero transformadas puede analizarse mediante inmunotinción utilizando un anticuerpo; análisis de la expresión en el nivel de proteína mediante transferencia Western como se describe en los ejemplos siguientes; o análisis de la expresión en el nivel de ARN por RT-PCR y similares. La expresión de la proteína F puede ser confirmada de forma alternativa observando la formación de sincitio durante la fusión celular de las células infectadas. La formación de sincitio se refiere a la formación de células gigantes que contienen una pluralidad de núcleos celulares debido a la co-expresión de la proteína F y otra proteína de la membrana viral, una proteína HN de unión al receptor, en una sola célula que provoca la fusión de células adyacentes. Cuando las células Vero a las que se espera incorporar el gen F se transfectan con un plásmido que contiene el gen HN y se confirma la formación de sincitio, se confirma que las células expresan funcionalmente el gen F. Por consiguiente, las células Vero recombinantes deseables que expresan el gen F pueden ser clonadas.

60 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un vector de virus paragripal humano de tipo 2 no proliferativo deficiente en el gen F. El método comprende las etapas de co-cultivar un virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F con la célula Vero de la presente invención que tiene el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 de tal manera que el gen F se expresa no induciblemente y aislar partículas virales de un sobrenadante del cultivo.

65 El término "vector viral" significa una partícula viral en la que se empaqueta un gen a expresar en una célula infectada y un gen genómico vírico.

El gen genómico vírico que carece del gen F puede construirse a partir de un plásmido que contiene un ADNc antisentido correspondiente al gen genómico completo del hPIV2 usando la técnica de recombinación génica convencional suprimiendo un gen F total o parcial o introduciendo una mutación del codón de parada dentro del gen F. Es preferible que el gen F entero se elimine con el fin de evitar que el vector viral administrado a un sujeto vuelva a adquirir la función del gen F debido a la mutación. El vector viral no proliferativo de acuerdo con la presente invención está diseñado preferiblemente para incluir un sitio de clonación para incorporar diversos genes terapéuticos.

Con el fin de producir partículas virales deficientes en el gen F del gen genómico viral que carece del gen F, se utiliza un plásmido construido para expresar el gen genómico viral que carece del gen F bajo el control de un promotor T7 para la transfección de células que expresan una ARN polimerasa de T7 junto con cuatro vectores que expresan la proteína F y una unidad de polimerasa (proteína NP, proteína P y proteína L) del hPIV2 o para la transfección de células Vero que expresan el gen F junto con cuatro vectores que expresan la ARN polimerasa de T7 y una unidad de polimerasa (proteína NP, proteína P y proteína L) del hPIV2. Las células infectadas se cultivan durante 3 a 6 días y las partículas virales deficientes en el gen F se pueden recoger de un sobrenadante del cultivo.

La infección de las partículas virales deficientes en el gen F así obtenidas con las células Vero que expresan el gen F de la presente invención permite la producción de partículas virales infecciosas que son proliferadas en las células, son partículas virales deficientes en el gen F y tienen la proteína F en la envoltura viral.

En una realización preferida de la presente invención, el vector viral basado en el virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F se incorpora con un gen terapéutico o de vacuna, de manera que la infección del vector viral no proliferativo obtenido por el presente método con una célula diana permite la introducción del gen terapéutico en la célula diana. El gen terapéutico es un gen que se expresa en una célula infectada y ejemplos del mismo pueden incluir un gen que codifica una proteína derivada de mamíferos incluyendo humanos o una parte de los mismos; un gen que codifica un antígeno tumoral o una parte del mismo; un gen derivado de bacterias o virus; un gen que codifica un anticuerpo terapéutico o una parte del mismo y un fragmento del mismo; y un gen que se obtiene introduciendo una mutación en el gen descrito anteriormente. El vector viral que contiene el gen derivado de bacterias o virus o un fragmento del mismo es útil como vacuna. El gen terapéutico puede incorporarse al gen del virus paragripal humano de tipo 2 de acuerdo con un método convencional que utiliza técnicas de ADN recombinante convencionales y técnicas de genética inversa.

El vector viral producido de acuerdo con la presente invención puede administrarse generalmente a células de mamífero incluyendo células humanas en forma de una pulverización. La pulverización se puede preparar de acuerdo con un método convencional. Por ejemplo, el pulverizador puede prepararse concentrando opcionalmente un sobrenadante del cultivo que contiene el vector viral, suspendiéndolo con un vehículo o excipiente apropiado en un tampón tal como PBS o solución salina, opcionalmente esterilizando el mismo a través de un filtro y similares y luego cargando el mismo en un recipiente esterilizado. La pulverización puede contener opcionalmente un estabilizante, un conservante y similares. El vector de expresión así obtenido puede administrarse a un sujeto por inhalación.

Las realizaciones descritas con la expresión "que comprende" tal como se usan en la presente memoria, abarcan las realizaciones descritas con la expresión "que consisten esencialmente en" y las realizaciones descritas con la expresión "que consiste en".

Los contenidos de todas las patentes y referencias citadas explícitamente en la presente memoria se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente a continuación a modo de ejemplos que no limitan la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de células Vero que expresan el gen F

En un plásmido que alberga un gen resistente a neomicina (Neo), así como una secuencia promotora de la β -actina aviar y una secuencia poliA de β -globina de conejo se introdujo el gen F escindido del gen genómico de hPIV2 para construir un plásmido pCXN2-F. Se usó un plásmido de control pCAL-F que se construyó de manera que expresara el gen F a través del sistema inducible Cre-loxP. Las células Vero se transfectaron con estos plásmidos usando Nucleofector de Amaxa.

Las células transfectadas se cultivaron en un medio que contenía neomicina (1 mg/ml) con el fin de seleccionar las células en cuanto a resistencia farmacológica a neomicina. Se aislaron 20 y 27 colonias con resistencia farmacológica a partir de las células en las que se introdujo pCXN2-F y de las células en las que se introdujo pCAL-F, respectivamente, y se examinaron en cuanto a la expresión del gen F. Las células en las que se usó el plásmido pCAL-F se infectaron con adenovirus que contenía el gen Cre para eliminar el fragmento génico innecesario en las

secuencias loxP e inducir la expresión del gen F.

A continuación, se examinó la formación de sincitio. Se preparó un plásmido SR α -HN que alberga el gen HN y se usó para la transfección de las células Vero resistentes a neomicina obtenidas usando Nucleofector. Después de 1 o 2 días, las células se observaron por microscopía para determinar la formación de sincitio y las células que forman sincitio se seleccionaron como células que expresan el gen F en esta selección secundaria. De los 20 clones aislados de las células en las que se introdujo pCXN2-F, 12 clones mostraron la capacidad de formar sincitio.

La expresión del gen F a nivel de ARN se midió a continuación mediante RT-PCR. Como resultado, de los 20 clones aislados de las células en las que se introdujo pCXN2-F, 12 clones mostraron la capacidad de formar sincitio, de los cuales 9 clones eran positivos en RT-PCR. De los 27 clones aislados de las células en las que se introdujo pCAL-F, 9 clones mostraron la capacidad de formar sincitio, de los cuales 7 clones eran positivos en RT-PCR. Las células Vero (2×10^6) en las que el gen F se introdujo a través de pCXN2-F y cultivadas durante un año se sometieron a RT-PCR de una sola etapa (QIAGEN). Los cebadores para la PCR se diseñaron para obtener un producto de amplificación por PCR de aproximadamente 550 pb cuando estaba presente el genoma viral deficiente en el gen F. Como resultado, se observaron bandas de productos de amplificación de PCR de alrededor de 550 pb en la PCR para tres clones diferentes, lo que confirmó además que el gen F permanecía para ser expresado (Fig. 2). De este modo, las células Vero que expresan constitutivamente el gen F podían obtenerse con una eficiencia equivalente a la de las células Vero que expresan induciblemente el gen F, siendo la expresión estable durante un período de tiempo prolongado. Esto indica que las células Vero tienen una alta tolerancia a la proteína F y pueden proliferar establemente incluso cuando el gen F se expresa constitutivamente durante un período de tiempo prolongado.

La expresión de la proteína F se examinó a continuación en las células Vero que expresan el gen F. Todas las proteínas de la membrana celular se biotinilaron utilizando 1 ml de solución Sulfo-NHS-LC-Biotina al 0,03% en $9,5 \times 10^5$ células Vero que expresan el gen y se prepararon 500 μ l de lisado celular en condiciones suaves. El lisado celular (300 μ l) se sometió a inmunoprecipitación utilizando 80 μ l de un anticuerpo específico de la proteína F con el fin de recuperar selectivamente y concentrar solo la proteína F mediante la unión al anticuerpo. La cantidad total de la muestra se sometió a SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF. La proteína F en esta etapa ya estaba biotinilada, de modo que formó un complejo de avidina-biotina mediante un método de formación de complejo avidina-biotina. Usando peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina, la proteína F biotinilada se detectó por emisión de luz de HRP después de la reacción con un reactivo de ECL (Fig. 3).

Ejemplo 2: Construcción del genoma de hPIV2 antisentido deficiente en el gen F

Se preparó un plásmido (hPIV2- Δ F-GFP) a partir de un plásmido que contenía un ADNc antisentido correspondiente al gen genómico entero de hPIV2 en dirección 3' de un promotor T7 suprimiendo completamente la secuencia que contenía la región que codifica el gen F total e incorporando una GFP (proteína de fluorescencia verde) en un sitio de restricción Not I (Fig. 4). La construcción se realizó mediante PCR multi-etapa usando cebadores que fueron diseñados basándose en las secuencias en sentido 3' y 5' del gen F; un fragmento génico de GFP escindido de un vector que contiene GFP comercializado y el plásmido que contiene el gen genómico de hPIV2 como molde.

Ejemplo 3: Recuperación de las partículas virales deficientes en el gen F usando células Vero que expresan F

Las células que expresan una ARN polimerasa de T7 se transfectaron con el plásmido (hPIV2- Δ F-GFP) preparado en el Ejemplo 2 usando lipofectamina o FUGENE 6 como un reactivo de transfección. Al mismo tiempo, se usaron también para la co-transfección 4 vectores que expresan la proteína F y una unidad de polimerasa (proteína NP, proteína P y proteína L) de hPIV2.

Las células se cultivaron durante 3 días y se recogió un sobrenadante que se usó para la infección de las células Vero que expresaban el gen F o células Vero normales sin expresión del gen F. Después de 6 días de la infección, se examinaron las células para determinar la fluorescencia GFP. La fluorescencia GFP se observó en todas las células Vero que expresan el gen F, mientras que el número de células Vero normales que emitían fluorescencia GFP fue mucho menor que el de las células Vero que expresan el gen F.

El sobrenadante del cultivo de las células Vero que expresan el gen F que emitía fluorescencia GFP se recogió y se usó para la infección de células Vero que expresan el gen F distinto en una placa de la que se recogió el sobrenadante. Estos procedimientos se repitieron tres veces antes de la centrifugación de 1,5 ml del sobrenadante a 1.000 xg durante 1 minuto para eliminar el residuo. El sobrenadante se centrifugó a continuación a 20.000 xg durante 30 minutos, de los cuales se desechó un sobrenadante y se suspendió un precipitado en 20 μ l de agua libre de ARNasa. La suspensión (0,5 μ l) se sometió a RT-PCR de una etapa (QIAGEN). Los cebadores para la PCR se diseñaron de manera que resultara una banda de aproximadamente 400 pb cuando estuviera presente el genoma viral deficiente en el gen F y una banda de aproximadamente 500 pb cuando se insertara el gen de GFP. Como resultado, las bandas de los productos de amplificación de PCR a aproximadamente 400 pb y aproximadamente 500 pb se observaron en las respectivas reacciones de PCR. Por lo tanto, se sugiere que se recuperó el virus PIV2 deficiente en el gen F.

- El sobrenadante del cultivo así obtenido de las células Vero que expresan el gen F que expresan GFP se pasaron a través de un filtro de 0,45 µm para eliminar el residuo. El sobrenadante del cultivo se sometió a una dilución en serie de 10 veces y se usó para la infección de células Vero sin expresión del gen F. Después de tres días, las células fueron examinadas en cuanto a la fluorescencia GFP. Como resultado, se observaron células que emiten fluorescencia GFP y el número de células positivas para GFP disminuyó proporcionalmente al factor de dilución. Así se confirmó que el sobrenadante del cultivo de las células Vero que expresan el gen F contenía el virus hPIV2 deficiente en el gen F que infectó las células Vero sin expresión del gen F. El sobrenadante del cultivo de las células Vero sin expresión del gen F no proporcionó partículas virales infecciosas.
- 10 La infección de las células NIH-3T3 de ratón con el virus hPIV2 deficiente en el gen F que alberga el gen GFP dio como resultado las células NIH-3T3 positivas para GFP. Sin embargo, la eficacia de la infección fue menor que la de las células Vero.

Ejemplo 4: Preparación del virus PIV2 deficiente en el gen F que expresa la proteína M2 del virus de la gripe

- 15 De la misma manera que en el Ejemplo 2, se construyó un plásmido (hPIV2-ΔF-M2) incorporando, en un sitio de restricción Not I del genoma de hPIV2 antisentido deficiente en el gen F, un gen de una proteína M2 (canal iónico M2) que existe en una membrana de la capa lipídica del virus de la gripe. Las células que expresan una ARN polimerasa de T7 se transfectaron con el plásmido (hPIV2-ΔF-M2) usando lipofectamina o FUGENE 6 como un reactivo de transfección de la misma manera que en el Ejemplo 3. Al mismo tiempo, se usaron también para co-transfección 4 vectores que expresan la proteína F y una unidad de polimerasa (proteína NP, proteína P y proteína L) del hPIV2. El virus se recuperó de la misma manera que en el Ejemplo 3 y se usó hPIV2 deficiente en el gen F que contenía el gen M2 para la infección de las células Vero que expresan el gen F (2×10^6). Las células se recogieron después de 2 días y se sometieron a transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-M2. En consecuencia, se confirmó la expresión de M2 (Fig. 5). Por lo tanto, se confirmó que el virus PIV2 deficiente en el gen F podía recuperarse también cuando se utilizaba un gen distinto a GFP.

- Basándose en los resultados anteriores, se observó que el uso de las células Vero que expresan el gen F permitía la recuperación del virus hPIV2 no proliferativo deficiente en el gen F y que este virus puede proliferar solo en células que expresan el gen F y puede infectar principalmente las células sin expresión del gen F sin producir virus infecciosos.

Aplicabilidad industrial

- 35 La presente invención es útil para la producción de vectores virales para terapia génica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un vector de virus paragripal humano de tipo 2 no proliferativo, que comprende las etapas de:
5 co-cultivar un virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F con una célula Vero que tiene el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 de tal manera que el gen F se expresa no induciblemente y aislar partículas virales de un sobrenadante del cultivo.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el virus paragripal humano de tipo 2 deficiente en el gen F tiene un gen en el que se ha incorporado una vacuna o un gen terapéutico.
3. Una célula Vero que tiene el gen F del virus paragripal humano de tipo 2 de tal manera que el gen F se expresa no induciblemente.
15

FIG.1

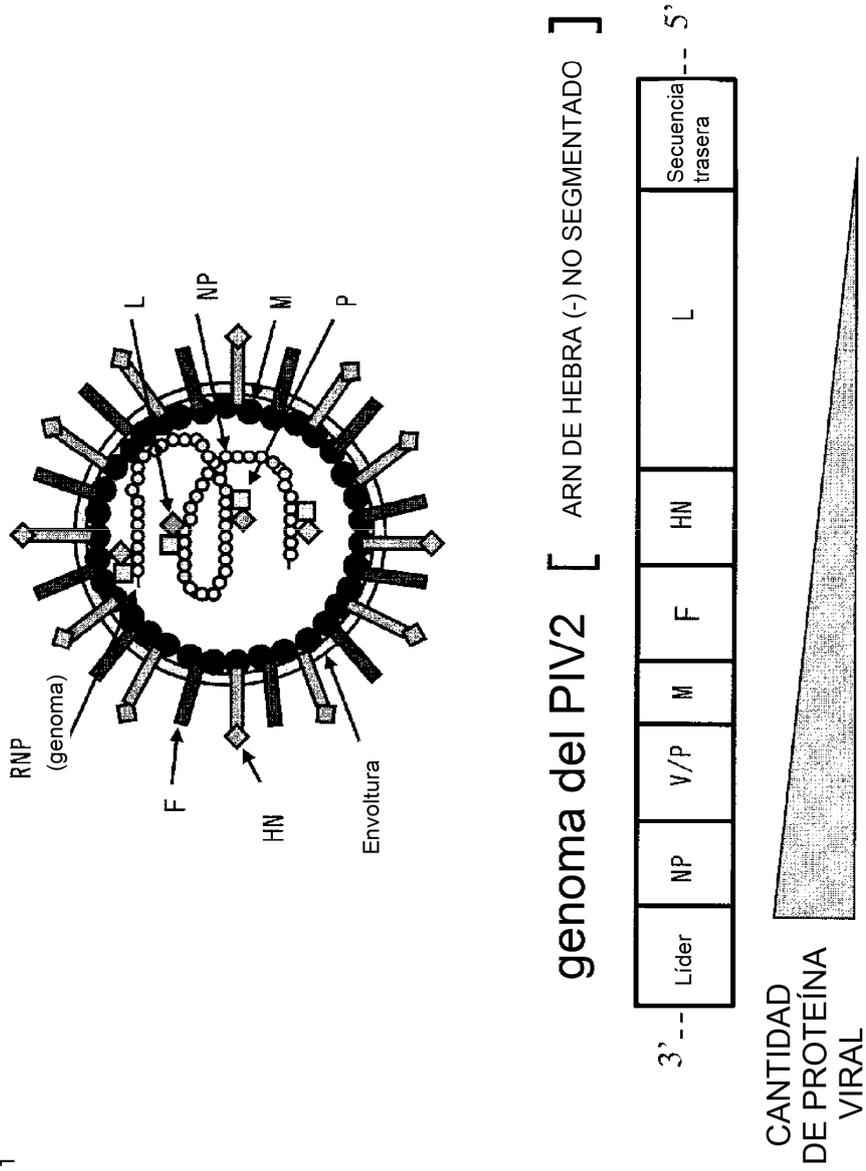
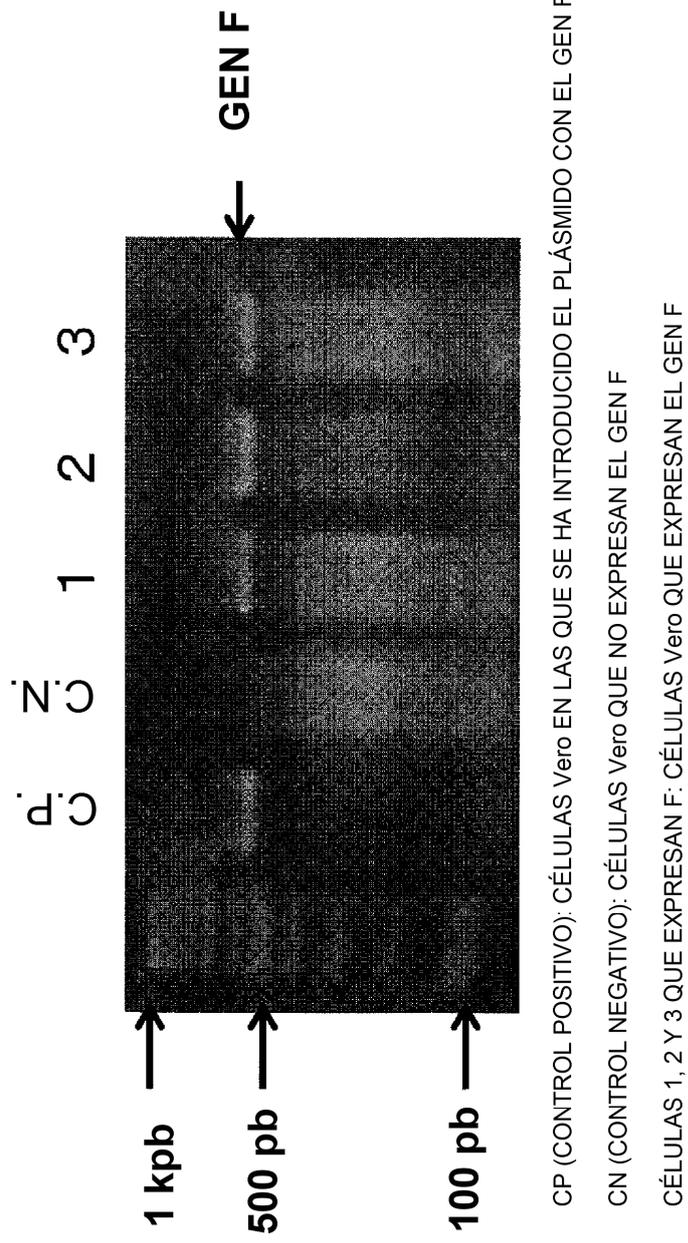


FIG.2



CÉLULAS Vero
QUE EXPRESAN EL GEN F CÉLULAS Vero

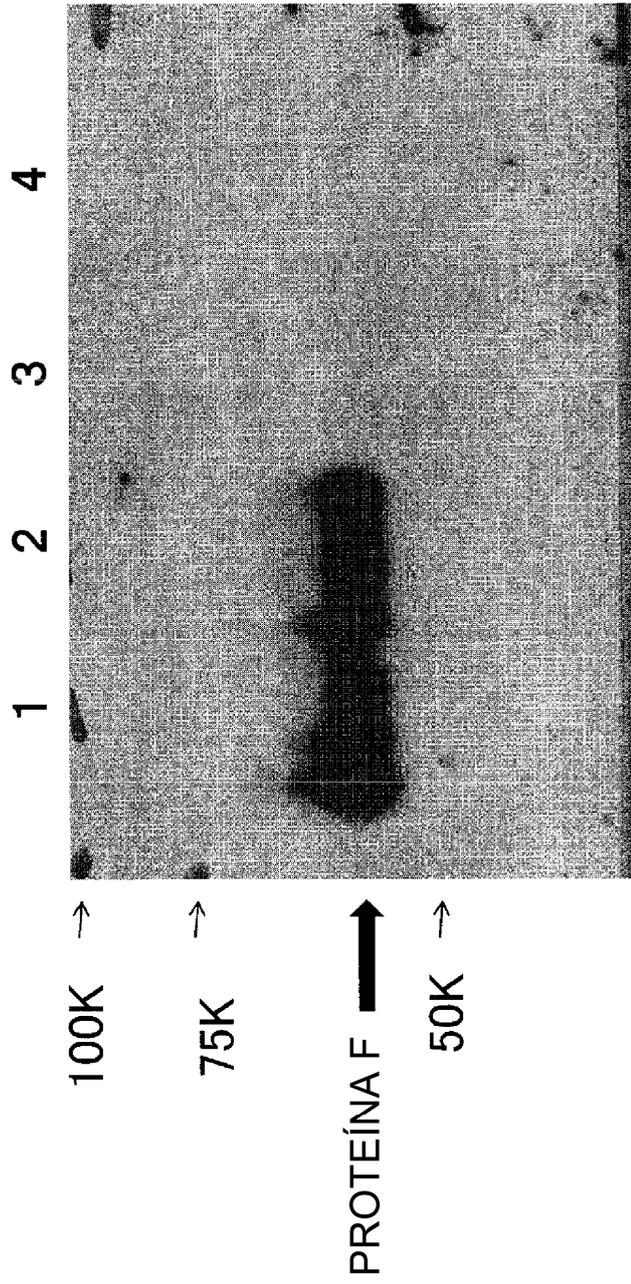


FIG.3

FIG.4

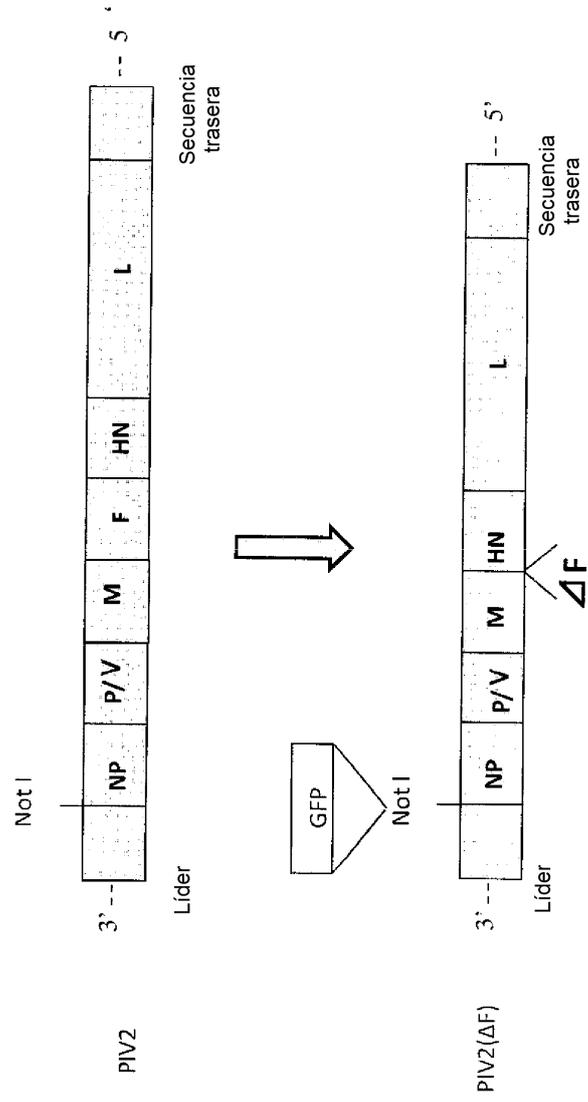
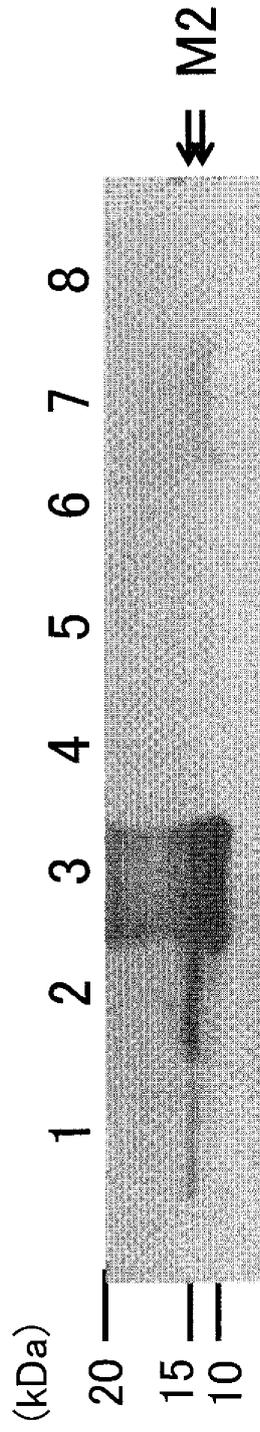


FIG.5



EXPRESIÓN DEL GEN M2 DEL VIRUS DE LA GRIPE (TRANSFERENCIA WESTERN)

CARRILES 1 Y 2: CONTROLES M2 POSITIVO

CARRILES 3 Y 7: CÉLULAS INFECTADAS CON Δ F/hPIV2 EN LAS QUE SE HA INTRODUCIDO EL GEN M2