

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 557**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.1999 E 10181977 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2316923**

54 Título: **Virus de la gripe atenuados con actividad antagonista de interferón alterada para uso como vacunas y productos farmacéuticos**

30 Prioridad:

12.06.1998 US 89103 P

18.11.1998 US 108832 P

29.01.1999 US 117683 P

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

07.02.2018

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(100.0%)**

**One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029, US**

72 Inventor/es:

**PALESE, PETER;
GARCIA-SASTRE, ADOLFO y
MUSTER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 653 557 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

Virus de la gripe atenuados con actividad antagonista de interferón alterada para uso como vacunas y productos farmacéuticos

1. Introducción

- 5 La presente invención se refiere, en general, a virus de la gripe quiméricos atenuados modificados por ingeniería genética que tienen una capacidad deteriorada de antagonizar la respuesta al interferón (IFN) celular, y al uso de tales virus atenuados en formulaciones de vacunas y formulaciones farmacéuticas. La aplicación también describe el desarrollo y uso de sistemas deficientes en IFN para la selección, identificación y propagación de tales virus atenuados.
- 10 En particular, la invención se refiere a virus de la gripe atenuados que tienen modificaciones en el gen NS1 que disminuyen o eliminan la capacidad del producto del gen NS1 de antagonizar la respuesta al IFN celular. Los virus mutantes se replican *in vivo*, pero demuestran una patogenicidad reducida y, por tanto, son muy adecuados para uso en vacunas de virus vivos y formulaciones farmacéuticas.

2. Fundamento de la invención

15 2.1 El virus de la gripe

Las familias de virus que contienen RNA monocatenario con envoltorio del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y virus de la enfermedad de Borna) o los que tienen genomas segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*). La familia *Orthomyxoviridae*, descrita con detalle más adelante, y empleada en los ejemplos de la presente memoria, incluye los virus de la gripe, tipos A, B y C, así como los virus de *Thogoto* y de *Dhori* y el virus de la anemia infecciosa de los salmones.

20

Los viriones de la gripe consisten en un núcleo de ribonucleoproteína interno (una nucleocápsida helicoidal) que contiene el genoma de RNA monocatenario, y una envoltorio de lipoproteína externa revestida en el interior por una proteína de la matriz (M1). El genoma segmentado del virus de la gripe A consiste en ocho moléculas (siete para el virus de la gripe C) de RNA monocatenarios de polaridad negativa, lineales que codifican diez polipéptidos, que incluyen: las proteínas RNA-polimerasas dependientes de RNA (PB2, PB1 y PA) y la nucleoproteína (NP) que forman la nucleocápsida; las proteínas membranales de la matriz (M1, M2); dos glicoproteínas de superficie que sobresalen de la envoltorio que contiene lípidos: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP). La transcripción y replicación del genoma tiene lugar en el núcleo y el ensamblaje ocurre por medio gemación en la membrana plasmática. Los virus pueden intercambiar genes durante las infecciones mixtas.

25

30

El virus de la gripe adsorbe por medio de la HA los sialiloligosacáridos de las glicoproteínas y los glicolípidos de la membrana celular. Después de la endocitosis del virión, ocurre un cambio conformacional en la molécula de HA dentro del endosoma celular lo que facilita la fusión de las membranas, desencadenando así el des-revestimiento. La nucleocápsida migra al núcleo en donde se transcribe el mRNA viral. El mRNA viral se transcribe por un mecanismo único en el cual la endonucleasa viral escinde el extremo 5' protegido de los mRNA heterólogos celulares que luego sirven como cebadores para la transcripción de los moldes de los RNA virales por la transcriptasa viral. Los transcritos terminan en sitios situados en 15 a 22 bases desde de los extremos de sus moldes, en donde las secuencias de oligo(U) actúan como señales para la adición de tramos de poli(A). De las ocho moléculas de RNA virales, así producidas, seis son mensajes monocistrónicos que son traducidos directamente a las proteínas que representan HA, NA, NP y las proteínas polimerasas virales, PB2, PB1 y PA. Los otros dos transcritos experimentan empalme, proporcionando cada uno dos mRNA que se traducen en diferentes marcos de lectura para producir M1, M2, NS1 y NEP. En otras palabras, los ocho segmentos de RNA virales codifican diez proteínas: nueve estructurales y una no estructural. Un resumen de los genes del virus de la gripe y sus productos proteínicos se muestra en la Tabla I siguiente.

35

40

45

TABLA 1

SEGMENTOS DE RNA DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA GRIPE Y ASIGNACIONES DE CODIFICACIÓN^a

Segmento	Longitud ^b (nucleótidos)	Polipéptido codificado ^c	Longitud ^d (aminoácidos)	Moléculas por virión	Comentarios
1	2341	PB2	759	30-60	Componente de RNA transcriptasa; unión de la protección del RNA celular del hospedante.
2	2341	PB1	757	30-60	Componente de RNA transcriptasa; Iniciación de la transcripción.
3	2233	PA	716	30-60	Componente de RNA transcriptasa.
4	1778	HA	566	500	Hemaglutinina; trímero; glicoproteína de la envoltente; media la unión a las células.
5	1565	NP	498	1000	Nucleoproteína; asociada con RNA; componente estructural de RNA transcriptasa.
6	1413	NA	454	100	Neuraminidasa; tetrámero; glicoproteína de la envoltente.
7	1027	M ₁	252	3000	Proteína de la matriz; reviste el interior de la envoltente.
		M ₂	96	?	Proteína estructural de la membrana plasmática; mRNA empalmado.
8	890	NS ₁	230	-	Proteína no estructural; función desconocida
		NEP	121	?	Proteína de exportación nuclear; mRNA empalmado

^a Adaptado de R. A. Lamb and P. W. Choppin (1983), *Annual Review of Biochemistry*, Volume 52, 467-506.

^b Para la cepa A/PR/8/34.

^c Determinado por métodos bioquímicos y genéticos

^d Determinada por análisis de secuencias de nucleótidos y secuenciación de proteínas

El genoma del virus de la gripe A contiene ocho segmentos de RNA monocatenario de polaridad negativa, que codifican una proteína no estructural y nueve proteínas estructurales. La proteína no estructural NS1 es abundante en células infectadas con el virus de la gripe, pero no ha sido detectada en viriones. NS1 es una fosfoproteína encontrada en el núcleo tempranamente durante la infección y también en el citoplasma en tiempos más tardíos del ciclo viral (King et al., 1975, *Virology* 64:378). Estudios con virus mutantes de la gripe sensibles a la temperatura (ts) que llevan lesiones en el gen NS sugirieron que la proteína NS1 es un regulador transcripcional y post-transcripcional de los mecanismos por los cuales el virus es capaz de inhibir la expresión de genes de la célula hospedante y estimular la síntesis de proteínas virales. Igual que otras muchas proteínas que regulan los procesos post-transcripcionales, la proteína NS1 interactúa con secuencias y estructuras de RNA específicas. Se ha descrito que la proteína NS1 se une a diferentes especies de RNA que incluyen: vRNA, poli-A, U6 snRNA, región no traducida en 5' de de los mRNA virales y dsRNA (Qiu et al., 1995, *RNA* 1:304; Qiu et al., 1994, *J. Virol.* 68:2425; Hatada Fukuda 1992, *J. Gen. Virol.* 73:3325-9. La expresión de la proteína NS1 a partir de cDNA en células transfectadas ha sido asociada con diversos efectos: inhibición del transporte nucleo-citoplásmico de mRNA, inhibición del empalme de pre-mRNA, inhibición de la poliadenilación del mRNA del hospedante y estimulación de la traducción del mRNA viral (Fortes, et al., 1994, *EMBO J.* 13:704; Enami, et al., 1994, *J. Virol.* 68:1432; de la Luna, et al., 1995, *J. Virol.* 69:2427; Lu, et al., 1994, *Genes Dev.* 8:1817; Park, et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 28433; Nemeroff et al., 1998, *Mol. Cell.* 1:1991; Chen, et al., 1994, *EMBO J.* 18:2273-83).

2.2 Virus atenuados

Las vacunas de virus inactivados se preparan "matando" el patógeno viral, por ejemplo, por calor o tratamiento con formalina, de modo que no sea capaz de replicación. Las vacunas inactivadas tienen una utilidad limitada porque no proporcionan inmunidad de larga duración y, por tanto, confieren una protección limitada. Una propuesta alternativa para producir vacunas de virus implica el uso vacunas de virus vivos atenuados. Los virus atenuados son capaces de replicación pero no son patógenos y, por tanto, proporcionan una inmunidad de mayor duración y confieren mayor protección. Sin embargo, los métodos convencionales para producir virus atenuados implican el aislamiento al azar de mutantes de la gama del hospedante, muchos de los cuales son sensibles a la temperatura; por ejemplo, el virus se somete a pases a través de hospedantes no naturales, y se seleccionan los virus de la progenie que son inmunógenos, pero no patógenos.

Un sustrato convencional para aislar y hacer crecer virus de la gripe para fines vacunales son los huevos de pollo embrionados. Los virus de la gripe se hacen crecer típicamente durante 2-4 días a 37°C en huevos de 10-11 días. Aunque la mayoría de los aislados primarios humanos de los virus de la gripe A y B crecen mejor en el saco amniótico de los embriones, después de 2 a 3 pases los virus llegan a adaptarse a crecer en las células de la cavidad alantoidea, que es accesible desde el exterior del huevo (Murphy, B. R., and R. G. Webster, 1996. *Orthomyxoviruses* pp. 1397-1445. En *Fields Virology*. Lippincott-Raven P. A.).

La tecnología del DNA recombinante y las técnicas de ingeniería genética, en teoría, proporcionarían una propuesta superior para producir un virus atenuado, puesto que se podrían producir deliberadamente por ingeniería genética mutaciones específicas en el genoma viral. Sin embargo, las alteraciones genéticas requeridas para la atenuación de virus ni se conocen ni son predecibles. En general, los intentos de usar la tecnología del DNA recombinante para obtener por ingeniería genética vacunas virales ha sido dirigida principalmente a la producción de vacunas subunitarias que solamente contienen las sub-unidades de proteínas del patógeno implicado en la respuesta inmunitaria, expresadas en vectores virales recombinantes, tales como el virus de la viruela de las vacas baculovirus. Más recientemente, las técnicas del DNA recombinante han sido utilizadas en un intento de producir mutantes por delección de herpesvirus o poliovirus que mimetizan los virus atenuados encontrados en la naturaleza o mutantes de la gama del hospedante conocidos. Hasta 1990, los virus de RNA de cadena negativa no eran susceptibles en absoluto de manipulación específica de sitios, y por tanto, no podían ser modificados por ingeniería genética.

El trabajo de Egorov A. et al., (*Transfect influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells*, *Journal of Virology*, The American Society of Microbiology, vol. 72, nº 8, August 1998, páginas 6437-6441) describe un sistema genético inverso para rescatar mutantes por delección específicos de NS1, es decir, NS1/124, NS1/80 y NS1/38, en los virus de la gripe A. Egorov et al., describen los virus de la gripe A que contienen 124, 80 y 38 aminoácidos en el extremo N-terminal de NS1.

Los virus de la gripe vivos atenuados producidos hasta ahora podrían no ser capaces de suprimir la respuesta al interferón en el hospedante en el que se replican. Por tanto, aunque estos virus son beneficiosos porque son inmunógenos y no patógenos, son difíciles de propagar en sustratos usuales para los fines de preparación de vacunas.

Además, los virus atenuados pueden poseer características de virulencia que son tan suaves que no permitan al hospedante provocar una respuesta inmunitaria suficiente para cumplir con las pruebas de virulencia subsiguientes.

3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona virus de la gripe quiméricos atenuados modificados por ingeniería genética, cuyo genoma: (i) comprende una secuencia heteróloga, que codifica para un segmento de gen de virus de la gripe, y (ii) codifica una proteína NS1 truncada que tiene 99 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 de una cepa de virus de la gripe, donde el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética tiene un fenotipo antagonista dañado.

En una realización, dicho segmento de gen de virus de la gripe es el segmento de gen de hemaglutinina o neuraminidasa. En otra realización, el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención es un virus de la gripe A. En otra realización, el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención es un virus de la gripe B.

La presente invención también proporciona formulaciones de vacunas que comprenden el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención y un excipiente fisiológicamente aceptable. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona formulaciones de vacunas que comprenden el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención, y un excipiente fisiológicamente aceptable, para usar en un método para prevenir una enfermedad infecciosa sensible al interferón, o provocar una respuesta inmune en un sujeto. En una realización, la enfermedad infecciosa sensible al interferón está causada por una infección del virus de la gripe.

Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para tratar tumores o prevenir la formación de tumores en un sujeto.

La presente invención proporciona también composición farmacéutica que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa sensible al interferón en un sujeto, o inducir una respuesta inmune en un sujeto. En una realización, la enfermedad infecciosa sensible al interferón es una infección viral. En una realización específica, la infección viral es una infección del virus de la gripe.

La presente invención se refiere en general al uso de virus de la gripe quiméricos atenuados modificados por ingeniería genética que tienen una capacidad deteriorada de antagonizar la respuesta al IFN celular, y al uso de dichos virus en formulaciones de vacunas y farmacéuticas. Los virus mutantes con una actividad antagonista de IFN deteriorada están atenuados – son infecciosos, pueden replicarse *in vivo* para proporcionar niveles sub-clínicos de infección y no son patógenos. Por tanto, son los candidatos ideales para vacunas de virus vivos. Además, los virus atenuados pueden inducir una fuerte respuesta al IFN que tiene otras consecuencias biológicas *in vivo*, confiriendo protección contra enfermedades infecciosas subsiguientes y/o induciendo respuestas antitumorales. Por tanto, los virus atenuados se pueden usar farmacéuticamente, para la prevención o tratamiento de otras enfermedades infecciosas, cáncer en individuos de alto riesgo y/o enfermedades que se tratan por IFN.

Los virus de RNA de cadena negativa referidos en la presente descripción, la invención incluyen tanto segmentados como no segmentados; algunos ejemplos incluyen pero no se limitan al virus de la gripe, virus sincitial respiratorio (RSV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus de la parainfluenza (PIV). Los virus descritos en la presente memoria se pueden seleccionar de cepas, variantes o mutantes de origen natural; virus mutagenizados (por ejemplo, generados por exposición a mutágenos, pases repetidos y/o pase en hospedantes no permisivos); virus con intercambio genético (en el caso de genomas virales segmentados); y/o virus modificados por ingeniería genética (por ejemplo, usando técnicas de "genética inversa") que tienen el fenotipo deseado – es decir, una capacidad deteriorada de antagonizar la respuesta al IFN celular. El virus mutante o modificado por ingeniería genética se puede seleccionar en base a su crecimiento diferencial en sistemas deficientes en IFN frente a sistemas competentes en IFN. Por ejemplo, pueden seleccionarse los virus que crecen en un sistema deficiente en IFN, pero no en un sistema competente en IFN (o que crecen peor en un sistema competente en IFN).

Los virus atenuados así seleccionados se pueden usar por sí mismos como el ingrediente activo en vacunas o formulaciones farmacéuticas. Alternativamente, el virus atenuado se puede usar como vector o "cadena principal" de las vacunas producidas recombinantemente. Para este fin, puede usarse la técnica de la "genética inversa" para introducir por ingeniería genética mutaciones o introducir epítomos extraños en el virus atenuado, que serviría como la cepa "parental". De este modo, pueden diseñarse vacunas para la inmunización contra variantes de cepas, o alternativamente, contra agentes infecciosos o antígenos patógenos completamente diferentes. Por ejemplo, el virus atenuado puede ser modificado por ingeniería genética para expresar epítomos neutralizantes de otras cepas preseleccionadas. Alternativamente, pueden ser construidos en el virus mutante atenuado epítomos de virus distintos de los virus de RNA de cadena negativa (por ejemplo, gp160, gp120 o gp41 del VIH). Alternativamente, en el virus pueden ser introducidos por ingeniería genética epítomos de patógenos infecciosos no virales (por ejemplo, parásitos, bacterias, hongos). En otra alternativa más, se pueden preparar vacunas contra el cáncer, por ejemplo modificando por ingeniería genética antígenos tumorales en la cadena principal del virus atenuado.

En un aspecto particular de la descripción que implica los virus de RNA con genomas segmentados, se pueden usar técnicas de intercambio genético para transferir el fenotipo atenuado de una cepa de virus de RNA segmentado parental (un mutante natural, un virus mutagenizado o un virus modificado por ingeniería genética) a una cepa viral diferente (un virus de tipo natural, un mutante natural, un virus mutagenizado o un virus modificado por ingeniería genética).

Los virus atenuados, que inducen fuertes respuestas al IFN en hospedantes, se pueden usar también en formulaciones farmacéuticas para la profilaxis o tratamiento de otras infecciones virales, o enfermedades que se pueden tratar con interferón, tales como cáncer. A este respecto, el tropismo del virus atenuado puede ser alterado para dirigir el virus a un órgano, tejido o células dianas deseados *in vivo* o *ex vivo*. Usando esta propuesta la respuesta al IFN puede ser inducida localmente en el sitio diana, evitando o minimizando de este modo los efectos secundarios de los tratamientos sistémicos con IFN. Para este fin, el virus atenuado puede ser modificado por ingeniería genética para expresar un ligando específico para un receptor del órgano, tejido o células dianas.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de que la NS1 del virus de la gripe de tipo natural actúa como un antagonista del IFN, porque la NS1 inhibe la respuesta mediada por IFN de células hospedantes infectadas por el virus. Se encontró que los mutantes virales deficientes en actividad de NS1 eran potentes inductores de la respuesta al IFN celular, y mostraron un fenotipo atenuado *in vivo*; es decir, los virus mutantes se replican *in vivo*, pero tiene efectos patógenos reducidos. Aunque no se pretende vincularse a ninguna teoría o explicación sobre cómo actúa la invención, las características atenuadas de los virus de la invención se deben presumiblemente a su capacidad para inducir fuertes respuestas al IFN celular, y su capacidad deteriorada para antagonizar la respuesta al IFN del hospedante. Sin embargo, las características beneficiosas de los virus atenuados de la invención pueden ser no solo atribuibles a los efectos de la respuesta al interferón celular. De hecho, las alteraciones en otras actividades asociadas a la NS1 pueden contribuir al fenotipo atenuado deseado.

Se demostró que los virus mutantes de la gripe con actividad antagonista de IFN deteriorada se replican *in vivo* generando títulos que son suficientes para inducir respuestas inmunológicas y de citoquinas. Por ejemplo, la vacunación con virus de la gripe atenuado redujo el título viral en animales que posteriormente fueron inoculados con virus de la gripe de tipo natural. Los virus de la gripe atenuados demostraron también actividad antiviral y antitumoral. La infección previa con virus de la gripe atenuados inhibió la replicación de otras cepas de virus de la gripe de tipo natural y otros virus (tal como el virus de Sendai) super-infectados en huevos embrionados. La inoculación de virus de la gripe atenuados en animales inyectados con células tumorales redujo el número de focos formados. Debido a que

se sabe que el virus de la gripe induce una respuesta de los CTL (linfocitos T citotóxicos), el virus atenuado es un candidato muy atractivo para vacunas contra el cáncer.

Para formulaciones de vacuna se prefieren mutaciones que disminuyan, pero no supriman, la actividad antagonista del IFN de los virus – tales virus pueden ser seleccionados para crecimiento tanto en sustratos convencionales como no convencionales, y para virulencia intermedia. En particular, los solicitantes han demostrado que un mutante por truncamiento del extremo C-terminal de NS1 se replica con títulos elevados en sustratos deficientes en IFN, tales como huevos de pollo embrionados de 6 y 7 días, así como en la membrana alantoidea de huevos de pollo embrionados de 10 días, el sustrato usual para el virus de la gripe que no permite el crecimiento de mutantes del virus de la gripe en los cuales está suprimido el gen NS1 completo (también denominados mutantes "inactivados"). Sin embargo, la replicación del mutante por truncamiento del extremo C-terminal de NS1 está disminuida en huevos de pollo embrionados de 12 días. Esta propuesta permite, por primera vez, la generación e identificación de virus vivos de RNA de cadena negativa atenuados que tienen alterada, pero no suprimida, la actividad antagonista de IFN y que son capaces de crecer en sustratos adecuados para la preparación de vacunas. Esta propuesta permite también, por primera vez, un sistema de selección e identificación para virus de la gripe u otros que contienen mutaciones que confieren actividad antagonista de interferón alterada, pero no suprimida.

La descripción también se refiere al uso de sistemas deficientes en IFN para propagar los virus atenuados que no pueden crecer en sistemas convencionales usados actualmente para la producción de vacunas pueden ser propagados en sistemas deficientes en IFN. La expresión "sistemas deficientes en IFN", tal como se usa en la presente memoria se refiere a sistemas, por ejemplo, células, líneas celulares y animales, tales como ratones, pollos, pavos, conejos, ratas, etc., que no producen IFN o producen bajos niveles de IFN, no responden o responden menos eficazmente al IFN y/o son deficientes en actividad de los genes antivirales inducidos por el IFN. Para este fin, los solicitantes han identificado o diseñado cierto número de sistemas deficientes en IFN que pueden ser usados, incluyendo, aunque sin limitación: huevos embrionados de pocos días, líneas celulares deficientes en IFN (tales como células VERO o líneas celulares modificadas por ingeniería genética, tales como las que tienen inactivado el gen STAT1). Alternativamente, los huevos embrionados o las líneas celulares pueden ser tratados previamente con compuestos que inhiben el sistema del IFN (incluyendo fármacos, anticuerpos, secuencias antisentido, ribozimas, etc.). Otro aspecto más de la descripción implica el uso de huevos deficientes en el sistema del IFN, por ejemplo, huevos producidos por aves negativas al STAT1, especialmente aves de corral, incluyendo, aunque sin limitación: pollos, patos o pavos transgénicos.

4. Descripción de las figuras

Fig. 1. El virus delNS1 inhibe la replicación del virus de la gripe A de tipo natural en huevos. Huevos de pollo embrionados de 10 días fueron inoculados con las UFP (unidades formadoras de placas) indicadas del virus delNS1. Ocho horas más tarde, los huevos fueron infectados con 10^3 UFP del virus WSN. Después de dos días de incubación a 37°C, se recogió el líquido alantoideo y se determinaron los títulos del virus WSN por ensayo en placas en células MDBK. Los resultados son el valor medio de dos huevos.

Fig. 2. Inducción de una respuesta antiviral en huevos embrionados por el virus delNS1. Se inocularon huevos de pollo embrionados de diez días con PBS (no tratados) o con 2×10^4 UFP del virus delNS1 (tratados con delNS1). Ocho horas más tarde, los huevos fueron entonces infectados con 10^3 UFP del virus de la gripe A/WSN/33 (H1N1), virus de la gripe A/PR8/34 (H+N1), virus de la gripe A/X-31 (H3N2), virus de la gripe B/Lee/40 o virus de Sendai. Después de dos días de incubación, se recogió el líquido alantoideo y se determinaron los títulos del virus por un ensayo de hemaglutinación. Los resultados son el valor medio de dos huevos.

Fig. 3. Se transfectaron células CV1 con un plásmido que expresa IRF-3 fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP). Esto permitió determinar la localización de IRF-3 en el interior de las células por microscopía de fluorescencia. En algunos casos, se co-transfectó un plásmido de expresión de NS1 con el plásmido de expresión de IRF-3 en las relaciones indicadas. 24 horas después de la transfección las células fueron infectadas a una alta multiplicidad de infección (abreviadamente moi por la expresión inglesa *multiplicity of infection*) con el virus PR8(WT) o con el virus delNS1 como se ha indicado. 10 horas después de la infección, las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia para la localización del IRF-3-GFP. Se indican los porcentajes de células que mostraban una localización citoplásmica exclusiva (CYT) y localizaciones tanto citoplásmicas como nucleares de IRF-3 (Nuc+CYT).

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona virus de la gripe quiméricos atenuados modificados por ingeniería genética, cuyo genoma: (i) comprende una secuencia heteróloga, que codifica para un segmento de gen de virus de la gripe, y (ii) codifica una proteína NS1 truncada que tiene 99 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 de una cepa de virus de la gripe, donde el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética tiene un fenotipo antagonista dañado.

En una realización, dicho segmento de gen de virus de la gripe es el segmento de gen de hemaglutinina o neuraminidasa. En otra realización, el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente

invención es un virus de la gripe A. En otra realización, el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención es un virus de la gripe B.

5 La presente invención también proporciona formulaciones de vacunas que comprenden el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención y un excipiente fisiológicamente aceptable. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención también proporciona formulaciones de vacunas que comprenden el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención, y un excipiente fisiológicamente aceptable, para usar en un método para prevenir una enfermedad infecciosa sensible al interferón, o provocar una respuesta inmune en un sujeto. En una realización, la enfermedad infecciosa sensible al interferón está causada por una infección de un virus de la gripe.

15 Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para tratar tumores o prevenir la formación de tumores en un sujeto.

20 La presente invención proporciona también composición farmacéutica que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa sensible al interferón en un sujeto, o inducir una respuesta inmune en un sujeto. En una realización, la enfermedad infecciosa sensible al interferón es una infección viral. En una realización específica, la infección viral es una infección del virus de la gripe.

La descripción se refiere a la generación, selección e identificación de virus de RNA de cadena negativa atenuados que tienen una capacidad deteriorada de antagonizar la respuesta al IFN celular y al uso de dichos virus en formulaciones de vacunas y farmacéuticas.

25 Los virus pueden tener genomas segmentados o no segmentados y se pueden seleccionar de cepas variantes o mutantes de origen natural; virus mutagenizados (por ejemplo, por exposición a irradiación UV, mutágenos, y/o pasajes); virus con intercambio genético (para virus con genomas segmentados); y/o virus modificados por ingeniería genética. Por ejemplo, los virus mutantes pueden ser generados por variación natural, exposición a irradiación UV, exposición a mutágenos químicos, por pasajes en hospedantes no permisivos, por intercambio genético (es decir, por co-infección de un virus segmentado atenuado con otra cepa que tiene los antígenos deseados) y/o por modificación por ingeniería genética (por ejemplo, usando "genética inversa"). Los virus seleccionados para uso en la invención tienen actividad antagonista de IFN defectuosa y están atenuados; es decir, son infecciosos y pueden replicarse *in vivo*, pero solo generan bajos títulos dando como resultado niveles de infección sub-clínicos que no son patógenos. Dichos virus atenuados son candidatos ideales para vacunas vivas.

35 En una realización preferida, los virus de la gripe atenuados seleccionados para uso en la invención deben ser capaces de inducir una fuerte respuesta al IFN en el hospedante -- una característica que contribuye a la generación de una fuerte respuesta inmunitaria cuando se usan como vacuna, y que tiene otras consecuencias biológicas que hacen que los virus sean útiles como agentes farmacéuticos para la prevención y/o tratamiento de otras infecciones virales o formación de tumores en individuos de alto riesgo u otras enfermedades que se tratan con IFN.

40 La invención se basa, en parte, en cierto número de descubrimientos y observaciones realizados por los solicitantes cuando trabajaban con mutantes del virus de la gripe. Sin embargo, los principios pueden ser aplicados y extrapolados análogamente a otros virus de RNA de cadena negativa segmentados y no segmentados incluyendo, aunque sin limitación: paramixovirus, (virus de Sendai, virus de la parainfluenza, virus de paperas, virus de la enfermedad de Newcastle), morbilivirus (virus del sarampión, virus del moquillo canino y virus de la peste del ganado); neumovirus (virus sincitial respiratorio y virus respiratorio bovino); y rhabdovirus (virus de la estomatitis vesicular y lyssavirus).

45 Primeramente, la respuesta al IFN es importante para contener la infección viral *in vivo*. Los solicitantes encontraron que el crecimiento del virus de la gripe de tipo natural A/WSN/33 en ratones deficientes en IFN (ratones STAT1 *-/-*) dio como resultado una infección pan-orgánica; es decir, la infección viral no estaba confinada a los pulmones como la está en los ratones de tipo natural que generan una respuesta al IFN (García-Sastre, et al., 1998, *J. Virol.* 72:8550). En segundo lugar, los solicitantes establecieron que la NS1 del virus de la gripe actúa como un antagonista del IFN. Los solicitantes descubrieron que un mutante del virus de la gripe con el gen NS1 completo suprimido (es decir, un gen NS1 "inactivado") no fue capaz de crecer con títulos altos en células hospedantes competentes en IFN, y solo podía propagarse en hospedantes deficientes en IFN. El virus con el gen NS1 inactivado demostró un fenotipo atenuado (es decir, fue letal en ratones STAT1 *-/-* deficientes en IFN, pero no en ratones de tipo natural) y se encontró que era un inductor potente de respuestas al IFN en células hospedantes (García-Sastre, et al., 1998, *Virology* 252:324-330). La infección previa con el virus mutante con el gen NS1 inactivado redujo los títulos del virus de la gripe de tipo natural y de otros virus (por ejemplo, el virus de Sendai) super-infectados en huevos embrionados. En otro experimento, la infección con el virus de la gripe mutante con el gen NS1 inactivado redujo la formación de focos en animales inoculados con células tumorales. Por tanto, el virus de la gripe con el gen NS1 inactivado demostró

interesantes propiedades biológicas. Sin embargo, los virus mutantes con el gen NS1 inactivado no podía propagarse en sistemas convencionales para la producción de vacuna. Para superar este problema, los solicitantes usaron y desarrollaron sistemas deficientes en IFN que permiten la producción de rendimientos razonables de virus atenuados.

5 Además, los solicitantes diseñaron mutantes por delección de NS1, que no suprimen el gen completo. Sorprendentemente, se encontró que estos mutantes NS1 presentaban un fenotipo "intermedio" -- el virus puede crecer en hospedantes convencionales usados para propagar el virus de la gripe (aunque el crecimiento es mejor en sistemas deficientes en IFN que proporcionan títulos mayores). Más importantemente, los mutantes por delección están atenuados *in vivo* e inducen una fuerte respuesta al IFN. La vacunación con los mutantes truncados de NS1 del virus de la gripe
10 dio como resultado bajos títulos de virus en animales subsiguientemente inoculados con virus de tipo natural, y confirieron protección contra la enfermedad.

La presente descripción se refiere también a los sustratos diseñados para el aislamiento, identificación y crecimiento de virus para fines vacunales. En particular, se describen sustratos deficientes en interferón para el crecimiento eficiente de mutantes del virus de la gripe. De acuerdo con la presente descripción, un sustrato deficiente en interferón es uno defectuoso en su capacidad de producir o responder al interferón. El sustrato descrito en la presente memoria se puede usar para el crecimiento de cualquier número de virus que puedan requerir un ambiente de crecimiento deficiente en interferón. Dichos virus pueden incluir, aunque sin limitación: paramixovirus (virus de Sendai, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle), morbilivirus (virus del sarampión, virus del moquillo canino y virus de la peste del ganado); neumovirus (virus sincitial respiratorio y virus respiratorio bovino); rhabdovirus (virus de la estomatitis vesicular y lyssavirus).
15 20

La invención se refiere también al uso del virus atenuado de la invención en vacunas y preparaciones farmacéuticas para seres humanos o animales. En particular, los virus atenuados pueden ser usados como vacuna contra una amplia gama de virus y/o antígenos, incluyendo aunque sin limitación: antígenos de variantes de cepas, virus diferentes u otros patógenos infecciosos (por ejemplo, bacterias, parásitos, hongos) o antígenos específicos de tumores.
25 En otra realización, los virus atenuados, que inhiben la replicación viral y la formación de tumores, se pueden usar para la profilaxis o tratamiento de infecciones (patógenos virales o no virales) o formación de tumores o tratamiento de enfermedades para la que el IFN es de beneficio terapéutico. Se pueden usar muchos métodos para introducir las formulaciones de virus vivos atenuados en un sujeto humano o animal para inducir una respuesta inmunitaria o de citoquinas apropiada. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación: vías intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. En una realización preferida, los virus atenuados de la presente invención se formulan para ser administrados por vía intranasal.
30

5.1 Generación de mutantes con actividad antagonista de IFN alterada

Los virus o cepas mutantes que tengan una actividad antagonista de IFN disminuida pueden estar en la naturaleza o producirse mediante mutagénesis. Se pueden seleccionar mutantes o variantes de origen natural o mutantes espontáneos que tengan una capacidad deteriorada de antagonizar la respuesta al IFN celular. Los virus mutantes pueden ser generados exponiendo el virus a mutágenos, tales como irradiación ultravioleta o mutágenos químicos, o por múltiples pases y/o pase en hospedantes no permisivos. Se puede usar cribado en un sistema de crecimiento diferencial para seleccionar los mutantes que tengan la función antagonista del IFN deteriorada. Para virus con genomas segmentados, el fenotipo atenuado puede ser transferido a otra cepa que tenga un antígeno deseado por intercambio de genético (es decir, por co-infección del virus atenuado y la cepa deseada, y selección de virus con intercambio genético que presenten ambos fenotipos).
35 40

Las mutaciones también pueden ser obtenidas por ingeniería genética en un virus de RNA de cadena negativa, tal como virus de la gripe, RSV, NDV, VSV y PIV, usando propuestas de "genética inversa". De este modo se pueden obtener por ingeniería genética mutaciones naturales o de otro tipo que confieran el fenotipo atenuado en cepas vacunales. Por ejemplo, se pueden obtener por ingeniería genética delecciones, inserciones o sustituciones de la región codificante del gen responsable de la actividad antagonista de IFN (tal como el NS1 del virus de la gripe). También se contemplan delecciones, sustituciones o inserciones en la región no codificante del gen responsable de la actividad antagonista del IFN. Para este fin, se pueden obtener por ingeniería genética mutaciones en las señales responsables de la transcripción, replicación, poliadenilación y/o empaquetamiento del gen responsable de la actividad antagonista del IFN. Por ejemplo, en el virus de la gripe, dichas modificaciones pueden incluir aunque sin limitación: sustitución de las regiones no codificantes de un gen del virus de la gripe A por regiones no codificantes de un gen del virus de la gripe B (Muster, et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5177), cambios de pares de bases en las regiones no codificantes de un gen del virus de gripe (Fodor, et al., 1998, *J. Virol.* 72:6283), mutaciones en la región promotora de un gen del virus de la gripe (Piccone, et al., 1993, *Virus Res.* 28:99; Li, et al., 1992, *J. Virol.* 66:4331), sustituciones y delecciones en el tramo de residuos de uridina en el extremo 5' de un gen de un virus de la gripe que afecta a la poliadenilación (Luo, et al., 1991, *J. Virol.* 65:2861; Li, et al., *J. Virol.* 1994, 68(2):1245-9). Dichas mutaciones, por ejemplo en el promotor, podrían sub-regular la expresión del gen responsable de la actividad antagonista de IFN. Las mutaciones en genes virales que puedan regular la expresión del gen responsable de la actividad antagonista del IFN están también dentro del alcance de los virus que pueden usarse de acuerdo con la invención.
45 50 55 60

La presente descripción se refiere también a mutaciones en el segmento del gen NS1 que pueden no dar como resultado una actividad antagonista del IFN alterada o un fenotipo inductor de IFN, sino que en lugar de ello dar como resultado funciones virales alteradas y un fenotipo atenuado, por ejemplo, inhibición alterada de la exportación nuclear de mRNA que contiene poli(A), inhibición alterada de empalmes de pre-mRNA, inhibición alterada de la activación de PKR por secuestro del dsRNA, efecto alterado sobre la traducción del RNA viral e inhibición alterada de la poliadenilación de mRNA del hospedante (por ejemplo, véase Krug en la obra *Textbook of Influenza*, Nicholson et al., Ed. 1998, 82-92, y las referencias citadas en dicho texto).

La técnica de la genética inversa implica la preparación de los RNA virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del RNA del virus de cadena negativa que son esenciales para el reconocimiento por las polimerasas virales y para el empaquetamiento de las señales necesarias para generar un virión maduro. Los RNA recombinantes se sintetizan a partir de un molde de DNA recombinante y se reconstituyen *in vitro* con complejo de polimerasa viral purificado para formar ribonucleoproteínas (RNP) recombinantes que pueden usarse para transfectar células. Se consigue una transfección más eficiente si las proteínas polimerasas virales están presentes durante la transcripción de los RNA sintéticos ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las RNP recombinantes sintéticas pueden ser rescatadas en partículas del virus infeccioso. Las técnicas anteriores están descritas en la patente de EE.UU. N° 5.166.057 concedida el 24 de noviembre de 1992; en la patente de EE.UU. N° 5.854.037 concedida el 29 de diciembre de 1998; en la publicación de patente europea EP 0702085A1, publicada el 20 de febrero de 1996; la patente de EE.UU. No. 6.146.842 concedida el 14 de noviembre de 2000; en las publicaciones de patentes internacionales PCT WO97/12032 publicada el 3 de abril de 1997; WO96/34625 publicada el 7 de noviembre de 1996; en la publicación de patente europea EP-A780475; WO 99/02657 publicada el 21 de enero de 1999; WO 98/53078 publicada el 26 de noviembre de 1998; WO 98/02530 publicada el 22 de enero de 1998; WO 99/15672 publicada el 1 de abril de 1999; WO 98/13501 publicada el 2 de abril de 1998; WO 97/06270 publicada el 20 de febrero de 1997; y EPO 78047SA1 publicada el 25 de junio de 1997.

Los virus atenuados generados por la propuesta de genética inversa se pueden usar en las formulaciones vacunales y farmacéuticas descritas en la presente memoria. Las técnicas de genética inversa se pueden usar también para introducir por ingeniería genética mutaciones adicionales en otros genes virales importantes para la producción de vacunas – es decir, los epítomos de variantes de cepas vacunales útiles pueden ser introducidos por ingeniería genética en los virus atenuados. Alternativamente, los epítomos completamente extraños, incluyendo los antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales pueden ser introducidos por ingeniería genética en la cepa atenuada. Por ejemplo, antígenos de virus no relacionados, tales como antígenos parásitos del VIH (gp160, gp120, gp41) (por ejemplo, del virus de la malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales, pueden ser introducidos por ingeniería genética en la cepa atenuada. Alternativamente, los epítomos que alteran el tropismo del virus *in vivo* pueden ser introducidos por ingeniería genética en los virus atenuados quiméricos de la invención.

Se puede usar una combinación de técnicas de genética inversa y técnicas de intercambio genético para modificar por ingeniería genética virus atenuados que tengan los epítomos deseados en virus de RNA segmentados. Por ejemplo, un virus atenuado (generado por selección natural, mutagénesis o por técnicas de genética inversa) y una cepa que lleva el epítomo vacunal deseado (generado por selección natural, mutagénesis o por técnicas de genética inversa) puede ser co-infectado en hospedantes que permitan el intercambio genético de los genomas segmentados. Se pueden seleccionar luego los productos de los intercambios genéticos que presenten tanto el fenotipo atenuado como el epítomo deseado.

El virus que ha de ser mutado también puede ser un virus de DNA (por ejemplo, el virus de la viruela de las vacas, adenovirus, baculovirus) o un virus de RNA de cadena positiva (por ejemplo, el poliovirus). En tales casos, se pueden usar los métodos de DNA recombinante que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. N° 4.769.330 de Paoletti y N° 4.215.051 de Smith).

Cualquier virus puede ser modificado por ingeniería genética de acuerdo con la presente descripción, incluyendo, aunque sin limitación, las familias que se recogen en la Tabla 2 siguiente.

TABLA 2**FAMILIAS DE VIRUS DE SERES HUMANOS Y ANIMALES**

<u>CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS</u>	<u>FAMILIA DE VIRUS</u>
dsDNA	
Con envoltente	Poxviridae Irididoviridae Herpesviridae
Sin envoltente	Adenoviridae Papovaviridae Hepadnaviridae
ssDNA	
Sin envoltente	Parvoviridae
dsRNA	
Sin envoltente	Reoviridae Birnaviridae
ssRNA	
Con envoltente	
Con genoma de sentido positivo	
Sin etapa de DNA en la replicación	Togaviridae Flaviviridae Coronaviridae Virus de la hepatitis C
Con etapa de DNA en la replicación	Retroviridae
Con genoma de sentido negativo	
Con genoma no segmentado	Paramyxoviridae Rhabdoviridae Filoviridae
Con genoma segmentado	Orthomyxoviridae Bunyaviridae Arenaviridae
Sin envoltente	Picornaviridae Caliciviridae

Abreviaturas usadas: ds = bicatenario; ss = monocatenario; con envoltente = que poseen una bicapa lipídica exterior derivada de la membrana de la célula hospedante; genoma de sentido positivo = para los virus de RNA, los genomas que están compuestos de secuencias de nucleótidos que se traducen directamente en los ribosomas, = para virus de DNA, genomas que están compuestos de secuencias de nucleótidos que son las mismas que las del mRNA; genoma de sentido negativo = genomas que están compuestos de secuencias de nucleótidos complementarias a la cadena de sentido positivo.

5 La descripción se refiere a virus de la gripe quiméricos atenuados modificados por ingeniería genética que contienen delecciones y/o truncamientos del producto génico NS1. Los mutantes de NS1 de los virus de gripe A y B son particularmente preferidos. En una propuesta, se retienen porciones de la región amino terminal del producto génico NS1, mientras que se suprimen porciones de la región C-terminal del producto génico NS1. Las mutaciones específicas deseadas pueden obtenerse por ingeniería genética por medio de inserción, delección o mutación de ácidos nucleicos en el codón apropiado. En particular, las proteínas NS1 truncadas pueden tener 1-60 aminoácidos, 1-70 aminoácidos, 1-80 aminoácidos, 1-90 aminoácidos (el aminoácido N-terminal es 1), y preferiblemente 90 aminoácidos; 10 1-100 aminoácidos, y preferiblemente 99 aminoácidos; 1-110 aminoácidos; 1-120 aminoácidos; o 1-130 aminoácidos, y preferiblemente 124 aminoácidos del producto génico NS1 de tipo natural.

15 La presente descripción se refiere también a cualquier virus de la gripe modificado por ingeniería genética en el cual el producto génico NS1 ha sido modificado por truncamiento o modificación de la proteína NS1 que confiere a los virus mutantes los siguientes fenotipos: la capacidad de los virus de crecer hasta altos títulos en sustratos no convencionales, tales como huevos de pollo de 6-7 días, o la capacidad de los virus de inducir una respuesta al interferón del hospedante. Para los virus de la gripe A, estos incluyen, aunque sin limitación: virus que tienen unos truncamientos en NS1.

Se describen en la presente memoria el uso de virus de la gripe A o B mutantes de origen natural que tienen el fenotipo atenuado, así como cepas de virus de la gripe modificadas por ingeniería genética para contener dichas mutaciones responsables del fenotipo atenuado. Para los virus de la gripe A, estos incluyen, aunque sin limitación: virus que tienen una NS1 de 124 aminoácidos (Norton et al., 1987, *Virology* 156:204-213). Para los virus de la gripe B, estos incluyen, aunque sin limitación: virus que tienen un mutante por truncamiento de NS1 que comprende 110 aminoácidos derivados del extremo N-terminal (B/201) (Norton et al., 1987, *Virology* 156:204-213) y virus que tienen un mutante por truncamiento de NS1 que comprenden 89 aminoácidos derivados del extremo N-terminal (B/AWBY-234) (Tobita et al., 1990, *Virology* 174:314-19). Se describe en la presente memoria el uso de mutantes de origen natural análogos a NS1/38, NS1/80, NS1/124 (Egorov, et al., 1998, *J. Virol.* 72(8):6437-41), así como los mutantes de origen natural, A/Turkey/ORE/71, B/201 o B/AWBY-234.

Los virus de la gripe atenuados pueden ser modificados adicionalmente por ingeniería genética para expresar antígenos de otras cepas vacunales (por ejemplo, usando genética inversa o intercambio genético). Alternativamente, los virus de la gripe atenuados pueden ser modificados por ingeniería genética, usando genética inversa o intercambio genético con virus modificados por ingeniería genética, para expresar epítomos completamente extraños, por ejemplo, antígenos de otros patógenos infecciosos, antígenos tumorales o antígenos diana. Puesto que el segmento NS del RNA es el más corto entre los ocho RNA virales, es posible que el segmento NS del RNA tolere mayores inserciones de secuencias heterólogas que otros genes virales. Además, el segmento NS del RNA dirige la síntesis de ocho niveles de proteínas en las células infectadas, lo que sugiere que sería un segmento ideal para inserciones de antígenos extraños. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, puede ser usado uno cualquiera de los ocho segmentos de los virus de la gripe para la inserción de secuencias heterólogas. Por ejemplo, cuando se desee la presentación de antígenos de superficie, se pueden usar los segmentos que codifican proteínas estructurales, por ejemplo, HA o NA.

5.2 Sistema de selección basado en restricción del hospedante

En esta memoria se describen métodos de selección de virus que tienen el fenotipo deseado, es decir, virus que tienen poca o ninguna actividad antagonista del IFN, independientemente de si se han obtenido de variantes naturales, variantes espontáneas (es decir, variantes que evolucionan durante la propagación del virus), variantes naturales mutagenizadas, virus con intercambio genético y/o virus modificados por ingeniería genética. Dichos virus pueden ser mejor cribados en ensayos de crecimiento diferencial que comparan el crecimiento en sistemas hospedantes deficientes en IFN frente a sistemas hospedantes competentes en IFN. Se seleccionan los virus que demuestran mejor crecimiento en sistemas deficientes en IFN frente a sistemas competentes en IFN; preferiblemente se seleccionan los virus que crecen hasta alcanzar títulos de al menos un log mayor en sistemas deficientes en IFN en comparación con un sistema competente en IFN.

Alternativamente, los virus puede ser cribados usando sistemas de ensayo con IFN por ejemplo, sistemas de ensayo basados en la transcripción en los cuales la expresión de un gen indicador es controlada por un promotor sensible al IFN. Puede medirse la expresión del gen indicador en células infectadas frente a no infectadas para identificar virus que inducen eficientemente una respuesta al IFN, pero que no son capaces de antagonizar la respuesta al IFN. En una realización preferida, sin embargo, se usan los ensayos de crecimiento diferencial para seleccionar virus que tienen el fenotipo deseado, puesto que el sistema hospedante usado (competente en IFN frente a deficiente en IFN) aplica la presión de selección apropiada.

Por ejemplo, se puede comparar el crecimiento de virus (medido por su título) en una variedad de células, líneas celulares o sistemas de modelos animales que expresan IFN y los componentes de la respuesta al IFN, frente a células, líneas celulares o sistemas de modelos animales deficientes en IFN o componentes de la respuesta al IFN. Para este fin, se puede comparar el crecimiento de virus en líneas celulares como las células VERO (que son deficientes en IFN) frente al crecimiento en células MDCK (que son competentes en IFN). Alternativamente, las líneas celulares deficientes en IFN pueden ser derivadas y establecidas de animales criados o modificados por ingeniería genética para que sean deficientes en el sistema del IFN (por ejemplo, ratones mutantes STAT1 ^{-/-}). Puede medirse el crecimiento del virus en dichas líneas celulares, en comparación con el crecimiento en células competentes en IFN derivadas, por ejemplo, de animales de tipo natural (por ejemplo, ratones de tipo natural). Incluso en otra realización, las líneas celulares que son competentes en IFN y que se sabe soportan el crecimiento del virus de tipo natural pueden modificarse por ingeniería genética para que sean deficientes en IFN (por ejemplo, inactivando los genes STAT1, IRF3, PKR, etc.). Se pueden usar métodos que son bien conocidos en la técnica para la propagación de virus en líneas celulares (véanse, por ejemplo, los ejemplos de trabajo que se facilitan más adelante). Se puede comparar el crecimiento del virus en la línea celular competente en IFN estándar frente al crecimiento del virus en la línea celular modificada por ingeniería genética deficiente en IFN.

También se pueden usar sistemas animales. Por ejemplo, para el virus de la gripe, se puede comparar el crecimiento en huevos embrionados de pocos días deficientes en IFN, por ejemplo, aproximadamente de 6 a aproximadamente 8 días, con el crecimiento en huevos competentes en IFN de más días, por ejemplo, de aproximadamente 10 a 12 días. Para este fin, se pueden usar métodos muy conocidos en la técnica para la infección y propagación en huevos (por ejemplo, véanse los ejemplos de trabajo que se facilitan más adelante). Alternativamente, puede compararse el crecimiento en ratones STAT1 ^{-/-} deficientes en IFN con el crecimiento en ratones de tipo natural competentes en IFN. Incluso en otra alternativa, se pueden comparar el crecimiento en huevos embrionados deficientes en IFN pro-

ducidos, por ejemplo, por un ave de corral transgénica STAT1 -/- con el crecimiento en huevos competentes en IFN producidos por un ave de corral de tipo natural.

Para fines de cribado, sin embargo, se pueden usar sistemas transitorios deficientes en IFN en lugar de sistemas manipulados por ingeniería genética. Por ejemplo, el sistema hospedante se puede tratar con compuestos que inhiban la producción de IFN y/o componentes de la respuesta al IFN (por ejemplo, fármacos, anticuerpos contra IFN, anticuerpos contra el receptor de IFN, inhibidores de PKR, moléculas antisentido y ribozimas, etc.). El crecimiento de virus se puede comparar en controles no tratados competentes en IFN frente a sistemas tratados deficientes en IFN. Por ejemplo, huevos de más días que son competentes en IFN pueden ser tratados previamente con dichos fármacos antes de la infección con el virus que se ha de cribar. El crecimiento se compara con el conseguido en los huevos de control no tratado de los mismos días.

Los métodos de cribado descritos en la presente memoria proporcionan un cribado sencillo y fácil para identificar virus mutantes con actividad antagonista de IFN suprimida por la incapacidad del virus mutante de crecer en ambientes sensibles al IFN, comparada con la capacidad del virus mutante de crecer en ambientes deficientes en IFN. Los métodos de cribado descritos en la presente memoria se pueden usar también para identificar virus mutantes con actividad antagonista de IFN alterada, pero no suprimida, midiendo la capacidad del virus mutante de crecer tanto en ambientes sensibles al IFN, por ejemplo, huevos embrionados de 10 días o células MDCK como en ambientes deficientes en IFN, por ejemplo, huevos embrionados de 6 a 7 días o células Vero. Por ejemplo, los virus de la gripe que muestran al menos un log menor del título en huevos de 10 días frente a huevos de 6-7 días se considerarán deteriorados en su capacidad de inhibir la respuesta al IFN. En otro ejemplo, los virus de la gripe que muestran al menos un log menor del título en huevos de 12 días (que provocan una alta respuesta al IFN) frente a huevos de 10 días (que provocan una respuesta moderada al IFN) se consideran parcialmente deteriorados en su capacidad de antagonizar la respuesta al IFN, y se consideran candidatos atractivos para vacunas.

Los métodos de selección descritos en la presente memoria abarcan también la identificación de los virus mutantes que inducen respuestas al IFN.

De acuerdo con los métodos de selección descritos, la inducción de respuestas al IFN puede ser medida analizando los niveles de expresión de IFN o la expresión de genes diana o genes indicadores inducida por IFN después de la infección con el virus mutante o la activación de transactivadores implicados en la expresión del IFN y/o la respuesta al IFN.

Incluso en otra realización de los sistemas de selección descritos, la inducción de las respuestas al IFN se puede determinar midiendo el estado fosforilado de los componentes de la vía del IFN después de la infección con el virus mutante de ensayo, por ejemplo, IRF-3, que se fosforila en respuesta al RNA bicatenario. En respuesta al IFN de tipo I, Jak1 quinasa y Tyk2 quinasa, subunidades del receptor de IFN, STAT1 y STAT2 son rápidamente fosforiladas en tirosinas. Por tanto, para determinar si el virus mutante induce respuestas a IFN, células tales como las células 293, se infectan con el virus mutante de ensayo y después de la infección, se lisan las células. Los componentes de la vía del IFN, tales como Jak1 quinasa o Tyk2 quinasa, son inmunoprecipitados de los lisados de las células infectadas, usando sueros policlonales o anticuerpos específicos, y se determina el estado fosforilado de las tirosinas de la quinasa por ensayos de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfotirosina (por ejemplo, véase Krishnan et al., 1997, *Eur. J. Biochem.* 247: 298-305). Un aumento del estado fosforilado de cualquiera de los componentes de la vía del IFN después de la infección con el virus mutante indicaría inducción de las respuestas al IFN por el virus mutante.

Incluso en otro aspecto, los sistemas de selección descritos comprenden medir la capacidad de unión de secuencias de DNA específicas o la translocación de factores de transcripción inducida en respuesta a la infección viral, por ejemplo, IRF3, STAT1, STAT2, etc. En particular, STAT1 y STAT2 son fosforiladas y translocadas desde el citoplasma al núcleo en respuesta al IFN de tipo I. La capacidad de unir secuencias de DNA específicas o la translocación de factores de transcripción puede medirse por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento en gel por electromovilidad, tinción de células etc.

Incluso en otro aspecto, los sistemas de selección descritos, la inducción de las respuestas al IFN se puede determinar midiendo la activación transcripcional dependiente de IFN después de infección con el virus mutante de ensayo. En este aspecto, se puede analizar la expresión de genes que se sabe que son inducidos por IFN, por ejemplo, Mx, PKR, 2-5-oligoadenilato-sintetasa, complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de la clase I, etc., por métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, transferencias de Northern, transferencias de Western, PCR, etc.). Alternativamente, las células de ensayo, tales como células embrionarias de riñón humanas o células de sarcoma osteogénico humano, se modifican por ingeniería genética para expresar transitoria o constitutivamente genes indicadores, tales como el gen indicador de luciferasa o el gen indicador de cloranfenicol-transferasa (CAT) bajo el control de un elemento de respuesta estimulado por interferón, tal como el promotor estimulado por IFN del gen ISG-54K (Bluyssen et al., 1994, *Eur. J. Biochem.* 220:395-402). Las células se infectan con el virus mutante de ensayo y el nivel de expresión del gen indicador se compara con el de las células no infectadas o células infectadas con el virus de tipo natural. Un aumento del nivel de expresión del gen indicador después de la infección con el virus de ensayo indicaría que el virus mutante de ensayo está induciendo una respuesta al IFN.

Incluso en otro aspecto, los sistemas de selección descritos comprenden medir la inducción de IFN determinando si un extracto de la célula o huevo infectado con el virus mutante de ensayo es capaz de conferir actividad protectora contra la infección viral. Más específicamente, grupos de huevos de pollo embrionados de 10 días se infectan con el virus mutante de ensayo o el virus de tipo natural. Aproximadamente 15 a 20 horas después de la infección, se recoge el líquido alantoideo y se analiza su actividad de IFN determinando la dilución más alta con actividad protectora contra la infección por VSV en células de cultivo de tejidos, tales como células CEF.

5.3 Propagación de virus en sustratos de crecimiento deficiente en interferón

Se describen en la presente memoria métodos y sustratos deficientes en IFN para el crecimiento y aislamiento de virus mutantes de origen natural o modificados por ingeniería genética que tienen actividad antagonista de IFN alterada. Los sustratos deficientes en IFN que se pueden usar para soportar el crecimiento de los virus mutantes atenuados incluyen, aunque sin limitación: células de origen natural, líneas celulares, animales o huevos embrionados que son deficientes en IFN, por ejemplo, células Vero, huevos embrionados de pocos días; células recombinantes o líneas celulares que están modificadas por ingeniería genética para que sean deficientes en IFN, por ejemplo, líneas celulares deficientes en IFN derivadas de ratones con el gen STAT1 inactivado u otros animales transgénicos modificados similarmente por ingeniería genética; huevos embrionados obtenidos de aves deficientes en IFN, especialmente aves de corral (por ejemplo, pollos, patos, pavos) incluyendo bandadas que son criadas para que sean aves deficientes en IFN o transgénicas (por ejemplo, con el gen STAT1 inactivado). Alternativamente, el sistema hospedante, las células, las líneas celulares, los huevos o los animales pueden ser modificados por ingeniería genética para expresar transgenes que codifican inhibidores del sistema del IFN, por ejemplo, mutantes dominantes negativos, tales como STAT1 que carece del dominio de unión al DNA, RNA antisentido, ribozimas, inhibidores de la producción del IFN, inhibidores de la señalización del IFN, y/o inhibidores de genes antivirales inducidos por IFN. Debe reconocerse que los animales que se crían o modifican por ingeniería genética para que sean deficientes en IFN estarán algo inmunocomprometidos, y deben mantenerse en un ambiente controlado libre de enfermedad. Por tanto, deben tomarse medidas apropiadas (incluyendo el uso de antibióticos en la dieta) para limitar el riesgo de exposición a agentes infecciosos de animales transgénicos deficientes en IFN, tales como bandadas de gallinas, patas, pavas ponedoras, etc. Alternativamente, el sistema hospedante, por ejemplo, las células, las líneas celulares, los huevos o los animales pueden ser tratados con un compuesto que inhiba la producción del IFN y/o la vía del IFN por ejemplo, fármacos, anticuerpos, moléculas antisentido, moléculas de ribozima que se dirijan al gen STAT1, y/o genes antivirales inducidos por IFN.

De acuerdo con la presente descripción, la expresión huevos embrionados de pollo inmaduros significa huevos que, naturalmente, de hasta menos de diez días, preferiblemente huevos de seis a nueve días; y huevos que artificialmente mimetizan huevos inmaduros de hasta menos de 10 días, como resultado de alteraciones en las condiciones del crecimiento, por ejemplo, cambios en las temperaturas de incubación; tratamiento con fármacos; o cualquier otra alteración que dé como resultado un huevo con un desarrollo retardado, tal que el sistema del IFN del huevo no esté completamente desarrollado en comparación con el de los huevos de 10 a 12 días.

5.3.1 Sustratos deficientes en IFN natural

La presente descripción se refiere al crecimiento de virus mutantes de origen natural y modificados por ingeniería genética en sustratos no convencionales, tales como huevos embrionados inmaduros que todavía no han desarrollado un sistema del IFN. Los huevos embrionados inmaduros no se usan normalmente para el crecimiento de virus debido a su frágil condición y menor volumen alantoideo. La presente descripción comprende hacer crecer virus mutantes en huevos embrionados de menos de 10 días; preferiblemente hacer crecer virus mutados en huevos embrionados de 8 días y más preferiblemente, en huevos de 6 a 8 días.

La presente descripción engloba también métodos de crecimiento y aislamiento de virus mutados que tienen actividad antagonista del IFN alterada en células y líneas celulares que naturalmente no tienen una vía del IFN o tienen una vía deficiente en IFN o tienen una deficiencia en el sistema del IFN, por ejemplo, bajos niveles de expresión del IFN en comparación con células de tipo natural. En particular, se describen en la presente memoria métodos de hacer crecer virus mutados que tienen una actividad antagonista del IFN alterada en células Vero.

5.3.2 Sustratos deficientes en IFN modificados por ingeniería genética.

Se describen en la presente memoria métodos de crecimiento y aislamiento de virus mutados que tienen actividad antagonista del IFN alterada en un sustrato deficiente en IFN modificado por ingeniería genética. Se describen en la presente memoria aves transgénicas en las que está mutado un gen esencial para el sistema del IFN, por ejemplo, STAT1, que pondrían huevos deficientes en IFN. También se describen en la presente memoria aves transgénicas que expresan factores de transcripción dominantes negativos, por ejemplo, STAT1 que carece del dominio de unión al DNA, ribozimas, RNA antisentido, inhibidores de la producción del IFN, inhibidores de la señalización del IFN e inhibidores de genes antivirales inducidos en respuesta al IFN. La ventaja de utilizar huevos de aves transgénicas deficientes en IFN es que se pueden usar huevos de 10 días convencionales para desarrollar el virus que son más estables y tienen un mayor volumen debido a su mayor tamaño. En otro aspecto más, las líneas celulares pueden ser modificadas por ingeniería genética para que sean deficientes en IFN. La presente descripción describe líneas

celulares en las que están mutados un gen esencial para la síntesis del IFN, la vía del IFN y/o uno o varios genes antivirales inducidos por IFN, por ejemplo, STAT1.

Se describen en la presente memoria líneas celulares o animales recombinantes, en particular aves, en los que está interrumpido uno o más genes esenciales para la vía del IFN, por ejemplo, receptor de interferón, STAT1, etc., es decir, es un gen "inactivado"; el animal recombinante puede ser cualquier animal, pero en un aspecto, es un ave, por ejemplo, pollo, pavo, gallina, pato, etc., (véanse, por ejemplo, Sang, 1994, *Trends Biotechnol.* 12:415; Perry, et al., 1993, *Transgenic Res.* 2:125; Stern, C.D., 1996, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 212:195-206; y Shuman, 1991, *Experientia* 47:897 para revisiones de la producción de productos transgénicos aviares). Dicho animal o línea celular puede ser generado por cualquier método conocido en la técnica para interrumpir un gen en el cromosoma del animal o de la célula. Dichas técnicas incluyen, aunque sin limitación, microinyección pronuclear (Hoppe & Wagner, 1989, Patente de EE.UU. No. 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus a líneas germinales (Van der Putten et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 82:6148-6152); direccionamiento de genes en células madre embrionarias (Thompson et al., 1989, *Cell* 56:313); electroporación de embriones (Lo, 1983, *Mol Cell. Biol.* 3:1803); y transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano et al., 1989, *Cell* 57:717); etc. Para una revisión de dichas técnicas, véase Gordon, 1989, *Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.* 115:171.

En particular, un animal con STAT1 inactivado se puede producir promoviendo la recombinación homóloga entre un gen STAT1 en su cromosoma y un gen STAT1 exógeno que ha sido biológicamente inactivado (preferiblemente por inserción de una secuencia heteróloga, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Métodos de recombinación homóloga para interrupción de genes en el genoma de ratón están descritos, por ejemplo, por Capecchi (1989, *Science* 244:1288) y Mansour et al. (1988, *Nature* 336:348).

En resumen, se aísla todo o una porción de un clon genómico STAT1 del DNA genómico de la misma especie que la célula o el animal inactivado. El clon genómico STAT1 se puede aislar por cualquier método conocido en la técnica para el aislamiento de clones genómicos (por ejemplo, sondando una genoteca de DNA genómico con una sonda derivada de una secuencia de STAT1, tales como las secuencias proporcionadas por Meraz et al., 1996, *Cell* 84:431; Durbin et al. 1996, *Cell* 84:443 y las referencias allí citadas). Una vez aislado el clon genómico, se introduce todo o una porción del clon en un vector recombinante. Preferiblemente, la porción del clon introducida en el vector contiene al menos una porción de un exón del gen STAT1, es decir, contiene una secuencia que codifica la proteína STAT1. A continuación, se introduce en el exón del gen STAT1 una secuencia no homóloga a la secuencia de STAT1, preferiblemente un marcador seleccionable positivo, tal como un gen que codifica un gen de resistencias a antibióticos. El marcador seleccionable está de preferencia unido operativamente a un promotor, más preferiblemente a un promotor constitutivo. La secuencia no homóloga se introduce en cualquier lugar de la secuencia codificadora de STAT1 interrumpiendo la actividad de STAT1, por ejemplo, en una posición en la que se ha demostrado que mutaciones puntuales u otras mutaciones inactivan la función de la proteína STAT1. Por ejemplo, aunque sin limitación, la secuencia no homóloga se puede insertar en la secuencia codificadora de la porción de la proteína STAT1 que contiene todo o una porción del dominio de quinasa (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica al menos 50, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos del dominio de quinasa).

El marcador seleccionable positivo es preferiblemente un gen de resistencia a la neomicina (gen *neo*) o un gen de resistencia a la higromicina (gen *hygro*). El promotor puede ser cualquier promotor conocido en la técnica; por ejemplo, el promotor puede ser promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK) (Adra et al., 1987, *Gene* 60:65-74), el promotor *Pol II* (Soriano et al., 1991, *Cell* 64:693-701) o el promotor MC1, que es un promotor sintético diseñado para su expresión en células madre derivadas de embriones (Thomas & Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-512). El uso de un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a antibióticos, permite la selección de células que tienen incorporado el vector de dirección (por ejemplo, la expresión del producto del gen *neo* confiere resistencia al G418 y la expresión del producto del gen *hygro* confiere resistencia a la higromicina).

En un aspecto, un marcador seleccionable negativo para una etapa de contraselección para recombinación homóloga, en oposición a no homóloga, del vector se inserta fuera del inserto del clon genómico STAT1. Por ejemplo, dicho marcador seleccionable negativo es el gen de timidina quinasa de HSV (*HSV-tk*), cuya expresión hace que las células sean sensibles al ganciclovir. El marcador seleccionable negativo está preferiblemente bajo el control de un promotor, tal como, aunque sin limitación, el promotor PGK, el promotor *Pol II* o el promotor MC1.

Cuando tiene lugar una recombinación homóloga, las porciones del vector que son homólogas al gen STAT1, así como el inserto no homólogo dentro de las secuencias del gen STAT1, se incorporan en el gen STAT1 en el cromosoma y se pierde el resto del vector. Por consiguiente, puesto que el marcador seleccionable negativo está fuera de la región de homología con el gen STAT1, las células en las que ha tenido lugar la recombinación homóloga (o su progenie), no contendrán el marcador seleccionable negativo. Por ejemplo, si el marcador seleccionable negativo es el gen *HSV-tk*, las células en las que ha tenido lugar la recombinación homóloga no expresarán la timidina quinasa y sobrevivirán expuestas al ganciclovir. Este procedimiento permite la selección de células en las que ha tenido lugar la recombinación homóloga, en comparación con la recombinación no homóloga en la que es probable que el marcador seleccionable negativo se incorpore también al genoma junto con las secuencias de STAT1 y el marcador seleccionable positivo. Por consiguiente, las células en las que ha tenido lugar una recombinación no homóloga expresarían más probablemente la timidina quinasa y serían sensibles al ganciclovir.

Una vez preparado el vector de dirección, se linealiza con una enzima de restricción para la que existe un sitio único en el vector de dirección y el vector linealizado se introduce en las células madre (ES) derivadas de embriones (Gossler et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069) por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por electroporación. Si el vector de dirección incluye un marcador seleccionable positivo y un marcador contraseleccionable negativo, las células ES en las que ha tenido lugar la recombinación homóloga se pueden seleccionar por incubación en medios selectivos. Por ejemplo, si los marcadores seleccionables son el gen *neo* y el gen *HSV-tk*, las células se exponen a G418 (por ejemplo, aproximadamente 300 µg/ml) y a ganciclovir (por ejemplo, aproximadamente 2 µM).

Se puede utilizar cualquier técnica conocida para la genotipificación, por ejemplo, aunque sin limitación, análisis por transferencia de Southern o reacción en cadena de la polimerasa, para confirmar que las secuencias de STAT1 interrumpidas se han recombinado homológamente en el gen STAT1 en el genoma de las células ES. Debido a que son conocidos el mapa de restricción del clon genómico STAT1 y la secuencia codificadora de STAT1 (véanse, Meraz et al., 1996, *Cell* 84:431; Durbin et al., 1996, *Cell* 84: 443-450 y todas las referencias allí citadas), se puede determinar el tamaño de un fragmento de restricción particular o de un producto de amplificación por PCR generado a partir de DNA tanto de los alelos interrumpidos como no interrumpidos. Por tanto, valorando un fragmento de restricción o un producto de PCR, se puede determinar la diferencia de tamaño entre el gen STAT1 interrumpido y no interrumpido, siempre que se haya realizado una recombinación homóloga para interrumpir el gen STAT1.

Las células ES con el locus STAT1 se pueden introducir a continuación en blastocistos por microinyección y a continuación los blastocistos se pueden implantar en los úteros de ratones seudopreñados usando técnicas habituales. El animal que se desarrolla a partir de los blastocistos implantados es quimérico en cuanto a los alelos interrumpidos. Los machos quiméricos se pueden cruzar con hembras y este cruce se puede diseñar de forma que la transmisión de la línea germinal del alelo esté relacionada con la transmisión de un cierto color de pelaje. La transmisión de la línea germinal del alelo se puede confirmar por transferencia de Southern o análisis por PCR, como se ha descrito antes, del DNA genómico aislado de muestras de tejidos.

5.3.3 Sustratos deficientes en IFN transitorios

Las células, líneas celulares, animales o huevos se pueden tratar con compuestos que inhiban el sistema del IFN. De acuerdo con la presente descripción, se pueden usar compuestos que inhiban la síntesis del IFN, o la actividad o la expresión de los componentes del sistema del IFN, para tratar previamente hospedantes, por ejemplo, compuestos que inhiban la síntesis del IFN, la actividad del IFN, el receptor del IFN, otras dianas en la vía de transducción de señales del IFN o que inhiban la actividad de los genes antivirales inducidos por IFN. Ejemplos de compuestos que se pueden usar de acuerdo con la presente descripción incluyen, aunque sin limitación, moléculas de ácidos nucleicos, anticuerpos, péptidos, antagonistas del receptor del IFN, inhibidores de la vía de STAT1, inhibidores de PKR, etc. De acuerdo con la presente descripción, las moléculas de ácidos nucleicos incluyen moléculas antisentido, ribozimas y moléculas de triple hélice que se dirigen a los genes que codifican componentes esenciales del sistema del IFN, por ejemplo, STAT1. Las moléculas de ácidos nucleicos abarcan también nucleótidos que codifican mutantes dominantes negativos de componentes del sistema del IFN; por ejemplo, antes de la infección con el mutante viral, las células se pueden transfectar con un DNA que codifica un mutante truncado incompetente para la señalización del receptor del IFN.

Los mutantes dominantes negativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para inhibir la vía del IFN incluyen versiones deficientes en quinasa de Jak1, Tyk2 o factores de transcripción que carecen de los dominios de unión al DNA STAT1 y STAT2 (véase, por ejemplo, Krishnan et al., 1997, *Eur. J. Biochem.* 247:298-305).

5.4 Formulaciones de vacunas

La invención abarca formulaciones de vacunas que comprenden el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la presente invención que tiene una capacidad deteriorada para antagonizar la respuesta al IFN celular, y un excipiente adecuado. El virus usado en una formulación para vacunas se puede seleccionar entre mutantes o variantes de origen natural, virus mutagenizados o virus modificados por ingeniería genética. También se pueden generar cepas atenuadas de virus con RNA segmentado por medio de técnicas de intercambio genético o utilizando una combinación de métodos de genética inversa y de intercambio genético. Las variantes de origen natural incluyen virus aislados de la naturaleza así como variantes que surgen espontáneamente generadas durante la propagación del virus, que tienen una capacidad deteriorada para antagonizar la respuesta al IFN celular. El virus atenuado se puede usar él mismo como principio activo en las formulaciones de vacunas. Alternativamente, el virus atenuado se puede usar como el vector o la "cadena principal" de las vacunas producidas de modo recombinante. Para este fin, se pueden aplicar técnicas recombinantes, tales como genética inversa (o, para virus segmentados, combinaciones de las técnicas de genética inversa y de intercambio genético) para mutaciones realizadas por ingeniería genética o la introducción de antígenos extraños en el virus atenuado usado en la formulación para vacunas. De este modo, se pueden diseñar vacunas para inmunización contra las variantes de cepas o alternativamente contra agentes infecciosos o antígenos patógenos completamente diferentes.

Virtualmente, se puede construir cualquier secuencia génica heteróloga en los virus de la invención para su uso en vacunas. Preferiblemente, pueden ser expresados por los virus, o parte de ellos, epítomos que induzcan una respuesta inmunitaria protectora para cualquiera de una variedad de patógenos o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes. Por ejemplo, secuencias génicas heterólogas que se pueden construir en los virus de la invención para su uso en vacunas incluyen, aunque sin limitación, epítomos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como gp120; antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); las glicoproteínas del herpesvirus (por ejemplo, gD, gE); VP1 de poliovirus; determinantes antigénicos de patógenos no virales, tales como bacterias y parásitos, por citar sólo algunos. En otra realización, pueden ser expresados todos los genes de inmunoglobulinas o parte de ellos. Por ejemplo, pueden ser construidas, en los virus de la invención, regiones variables de inmunoglobulinas anti-idiotípicas que imitan dichos epítomos. En otra realización más, se pueden expresar antígenos asociados a tumores.

Se puede formular bien una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada. Se prefiere una vacuna viva debido a que la multiplicación en el hospedante conduce a un estímulo prolongado de similar clase y magnitud que la existente en las infecciones naturales y, por consiguiente, confiere una inmunidad sustancial duradera. La producción de dichas formulaciones de vacunas virales recombinantes vivas se puede realizar usando métodos convencionales que impliquen la propagación del virus en un cultivo celular o en la membrana alantoidea del embrión de pollo, seguido de purificación.

Las formulaciones de vacunas pueden incluir virus de RNA de cadena negativa modificados por ingeniería genética que tienen mutaciones en el gen NS1 o análogos incluyendo, aunque sin limitación, los virus mutantes de la gripe NS1 truncados descritos en los ejemplos de trabajo incluidos más adelante. También se pueden formular usando virus variantes naturales, tales como A/turkey/Ore/71 natural, variante de la gripe A o B/201 y B/AWBY-234, que son variantes naturales del virus de la gripe B. Cuando se formula como una vacuna viral viva, se debe usar un intervalo entre aproximadamente 10^4 UFP y aproximadamente 5×10^6 UFP por dosis.

Se pueden utilizar muchos métodos para administrar las formulaciones de vacunas antes descritas, incluyendo, aunque sin limitación, vías intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. Puede ser preferible administrar la formulación de vacuna viral por la vía de la infección natural del patógeno para el que se diseña la vacuna o por la vía de la infección natural del virus atenuado parental. Cuando se usa una preparación de vacuna del virus de la gripe vivo, puede ser preferible administrar la formulación por la vía de infección natural del virus de la gripe. Se puede usar ventajosamente la capacidad del virus de la gripe para inducir una enérgica respuesta inmunitaria celular y secretora. Por ejemplo, la infección de las vías respiratorias por virus de la gripe puede inducir una fuerte respuesta inmunitaria secretora, por ejemplo en el sistema urogenital, con protección simultánea contra un agente particular causante de la enfermedad.

Podría administrarse de una vez una vacuna de la presente invención, que comprenda 10^4 - 5×10^6 UFP de virus mutantes con la actividad antagonista del IFN alterada. Alternativamente, podría administrarse dos o tres veces, con un intervalo de 2 a 6 meses entre dosis, una vacuna de la presente invención, que comprenda 10^4 - 5×10^6 UFP de virus mutantes con la actividad antagonista del IFN alterada. Alternativamente, podría administrarse con la frecuencia necesaria a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano, una vacuna de la presente invención, que comprenda 10^4 - 5×10^6 UFP de virus mutantes con la actividad antagonista del IFN alterada.

5.5 Composiciones farmacéuticas

La presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden virus de la gripe quiméricos atenuados modificados por ingeniería genética de la presente invención con actividad antagonista del IFN disminuida para usarse como agentes anti-virales o agentes antitumorales o como agentes contra las enfermedades infecciosas sensibles al IFN. Las composiciones farmacéuticas tienen utilidad como agente profiláctico anti-viral y pueden administrarse a un individuo con riesgo de ser infectado por un virus o de estar expuesto a él. Por ejemplo, en el caso de un niño que llega a su casa desde la escuela donde ha estado expuesto a varios compañeros con gripe, los padres administrarían la composición farmacéutica anti-viral de la invención a ellos mismos, al niño y a otros miembros de la familia, para evitar la infección viral y las enfermedades subsiguientes. También pueden ser tratadas las personas que viajan a partes del mundo donde son prevalentes ciertas enfermedades infecciosas (por ejemplo, virus de la hepatitis A, malaria, etc.).

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para tratar tumores o evitar la formación de tumores, por ejemplo, en pacientes que tienen cáncer o los que tienen alto riesgo de desarrollar neoplasmas o cánceres. Por ejemplo, se pueden tratar pacientes con cáncer para evitar otras carcinogénesis. Alternativamente, se pueden tratar sujetos que están expuestos a carcinógenos o se espera que estén expuestos a ellos; se pueden tratar individuos implicados en la limpieza ambiental que pueden estar expuestos a contaminantes (por ejemplo, amianto). Alternativamente, se pueden tratar individuos que están expuestos a radiación antes y después de su exposición (por ejemplo, pacientes expuestos a alta dosis de radiación o que deben tomar fármacos carcinógenos).

El uso de los virus atenuados de la invención como agentes antitumorales se basa en el descubrimiento de los solicitantes de que un mutante del virus de la gripe atenuado que contenía una deleción en su gen antagonista del IFN es capaz de reducir la formación de tumores en ratones. Las propiedades antitumorales de la invención pueden estar relacionadas al menos parcialmente con su capacidad para inducir IFN y respuestas al IFN. Alternativamente, las

propiedades antitumorales de los virus atenuados de la invención pueden estar relacionadas con su capacidad para crecer específicamente en las células tumorales y eliminarlas, muchas de las cuales se sabe que tienen deficiencias en el sistema del IFN. Independientemente del mecanismo(s) molecular(es) responsable de las propiedades antitumorales, los virus atenuados de la invención se pueden usar para tratar tumores o para prevenir la formación de tumores.

La presente descripción abarca además los virus mutantes con un fenotipo antagonista del IFN alterado que son dirigidos a órganos, tejidos y/o células específicos en el organismo con el fin de inducir localmente efectos terapéuticos o profilácticos. Una ventaja de dicha propuesta es que los virus inductores del IFN de la invención son dirigidos a sitios específicos, por ejemplo la localización de un tumor, para inducir IFN de manera específica del sitio para un efecto terapéutico en lugar de inducir sistémicamente IFN lo que puede tener efectos tóxicos.

Los virus mutantes inductores del IFN de la invención pueden ser modificados por ingeniería genética usando los métodos descritos en la presente memoria para expresar proteínas o péptidos que dirigirán los virus a un sitio particular. En una realización preferida, los virus inductores del IFN serían dirigidos a sitios de tumores. En tal realización, los virus mutantes pueden ser modificados por ingeniería genética para expresar el sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo que reconoce el antígeno específico del tumor, dirigiendo así al tumor el virus inductor del IFN. En otra realización más, cuando el tumor diana expresa un receptor de hormonas, tales como los tumores de mama u ovarios que expresan receptores de estrógenos, el virus inductor del IFN puede ser modificado por ingeniería genética para expresar la hormona apropiada. En aún otra realización más, cuando el tumor diana expresa un receptor de un factor de crecimiento, por ejemplo, VEGF, EGF o PDGF, el virus inductor del IFN se puede modificar por ingeniería genética para expresar el factor de crecimiento apropiado o sus porciones. Por consiguiente, de acuerdo con la invención, los virus inductores del IFN se pueden modificar por ingeniería genética para expresar cualquier producto génico diana, incluyendo péptidos, proteínas, tales como enzimas, hormonas, factores del crecimiento, antígenos o anticuerpos, que actuarán para dirigir el virus hasta un sitio que necesite actividad anti-viral, antibacteriana, anti-microbiana o anticancerosa.

Los métodos de introducción incluyen, aunque sin limitación: las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de un bolo, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa bucal, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, en una realización preferida puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en los pulmones por cualquier vía adecuada. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, utilizando un inhalador o nebulizador, y realizando la formulación con un agente aerosolizante.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente a la zona que necesita el tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo, aunque sin limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas siálicas o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio antiguo) de un tumor maligno o tejido neoplásico o pre-neoplásico.

Incluso en otra realización, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (véanse, Langer, supra; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (véanse, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), *CRC Pres.*, Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger & Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse también Levy et al., 1985, *Science* 228:190; Doring et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Incluso en otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana de la composición, es decir, el pulmón, requiriendo por tanto sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada fueron revisados por Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del virus atenuado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o recogido en la Farmacopea de EE.UU. u otras farmacopeas generalmente reconocidas para uso en animales y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se administra la composición farmacéutica. También se pueden emplear como vehículos líquidos soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. Estas composiciones se pueden

formular como un supositorio. La formulación oral puede incluir vehículos estándares, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son los descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se obtenga la forma de administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse a la forma de administración.

La cantidad de la composición farmacéutica de la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o estado particular dependerá de la naturaleza del trastorno o estado y puede ser determinada por técnicas clínicas estándares. Además, se pueden emplear valoraciones *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se ha de emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para administración son generalmente alrededor de 10^4 - 5×10^6 UFP y se pueden administrar una vez o múltiples veces con intervalos tan frecuentes como sea necesario. Las composiciones farmacéuticas para uso de la presente invención comprenden 10^4 - 5×10^6 UFP de virus mutantes con la actividad antagonista del IFN alterada, y se pueden administrar intranasalmente, intratraquealmente, intramuscularmente o subcutáneamente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas dosis-respuesta obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

6. Ejemplo: generación y caracterización de los mutantes por truncamiento de NS1 del virus de la gripe A

6.1 Materiales y métodos

El virus de la gripe A/PR/8/34 (PR8) se propagó en huevos de pollo embrionados de 10 días a 37°C. El virus de la gripe A 25A-1, un virus con intercambio genético que contiene el segmento NS de la cepa adaptada en frío A/Leningrad/134/47/57 y los genes restantes del virus PR8 (Egorov et al., 1994, *Vopr. Virusol.* 39:201-205; Shaw et al., 1996, en *Options of the control of influenza III*, eds. Brown, Hampson Webster (Elsevier Science) pp. 433-436) se hizo crecer en células Vero a 34°C. El virus 25A-1 es sensible a la temperatura en células de mamífero y se utilizó como virus auxiliar para la recuperación del virus transfectante NS1/99. Para el crecimiento del virus de la gripe se usaron células Vero y células MDCK mantenidas en medio esencial mínimo (MEM) que contenían 1 µg/ml de tripsina (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Se usaron también las células Vero para selección, purificación en placas y titulación del virus NS1/99. Las células MDCK se mantuvieron en DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco) que contenía 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor. Las células Vero se desarrollaron en medio AIM-V (Life Technologies, Grand Island, NY).

El plásmido pT3NS1/99, que contiene una forma truncada del C-terminal de 99 aminoácidos de NS1, se formó como sigue. En primer lugar, pPUC19-T3/NS PR8, que contenía el gen NS completo del virus PR8 flanqueado por el promotor de RNA polimerasa de T3 y el sitio de restricción BpuAI, se amplificó por PCR inversa (Ochman et al., 1988, *Genetics* 120:621-623) usando los cebadores apropiados. El cDNA obtenido que contenía por consiguiente el gen NS1 truncado se fosforiló, se trató con el fragmento Klenow, se autoligó y se propagó en la cepa TG1 de *E. coli*. La construcción obtenida después de purificación se denominó pT3NS1/99 y se verificó por secuenciación. Los plásmidos para expresión de las proteínas NP, PB1, PB2 y PA del virus PR8 (pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2 y pHMG-PA) habían sido descritos anteriormente (Pleschka et al., 1996, *J. Virol.* 70:4188-4192). pPOLI-NS-RB se formó sustituyendo el marco de lectura abierto CAT de pPOLI-CAT-RT (Pleschka et al., 1996, *J. Virol.* 70:4188-4192) dentro del producto obtenido por RT-PCR derivado de la región codificadora del gen NS del virus de la gripe A/WSN/33 (WSN). Este plásmido expresa el segmento de RNA viral específico de NS del virus WSN bajo el control de un promotor truncado de polimerasa I humana.

La generación del virus NS1/99 se realizó por transfección de ribonucleoproteínas (RNP) (Luytjes et al., 1989, *Cell* 59:1107-1113). Las RNP se formaron por transcripción de RNA polimerasa de T3 desde pT3NS1/99 linealizado con BpuAI en presencia de nucleoproteína y polimerasa purificadas del virus de la gripe 25A-1 (Enami, et al., 1991, *J. Virol.* 65:2711-2713). Los complejos de RNP se transfectaron en células Vero que habían sido infectadas previamente con el virus 25A-1. Las células transfectadas se incubaron durante 18 horas a 37°C y el líquido sobrenadante se sometió a dos pases en células Vero a 40°C y se purificó en placa tres veces en células Vero cubiertas con medios de revestimiento de agar-agar a 37°C. El virus NS1/99 aislado se analizó por RT-PCR usando cebadores específicos. El virus transfectante de tipo natural se generó como sigue: células Vero en cápsulas de 35 mm se transfectaron con plásmidos pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2, pHMG-PA y pPOLI-NS-RB, como había sido descrito anteriormente (Pleschka et al., 1996, *J. Virol.* 70:4188-4192). Dos días después de la transfección, las células se infectaron con 5×10^4 UFP del virus delNS1 y se incubaron dos días más a 37°C. El líquido sobrenadante celular se sometió a un pase en células MDCK y a dos pases en huevos de pollo embrionados. Los virus transfectantes se clonaron por dilución limitante en huevos. El RNA genómico del virus transfectante NS1/99 purificado se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida, como había sido descrito anteriormente (Zheng et al., 1996, *Virology* 217:242-251). La expresión de una proteína NS1 truncada por el virus NS1/99 se verificó inmunoprecipitando extractos de células infectadas marcadas usando un antisuero policlonal de conejo contra NS1.

Las cavidades alantoideas de huevos de pollo embrionados de 6, 10 y 14 días se inocularon con aproximadamente 10^3 UFP de virus PR8, NS1/99 o delNS1 (en los que se había suprimido el gen NS1 completo), se incubaron a 37°C

durante dos días y los virus presentes en el líquido alantoideo se titularon mediante valoración por hemaglutinación (HA).

Grupos de 5 ratones BALB/c (Taconic Farms) se inocularon intranasalmente con 5×10^6 UFP, $1,5 \times 10^5$ UFP o 5×10^3 UFP de virus A/PR/8/34 (PR8) o NS1/99 de tipo natural. Las inoculaciones se realizaron con anestesia usando 50 μ l de MEM que contenía el número apropiado de unidades formadoras de placas del virus apropiado. Se vigilaron diariamente los animales que se sacrificaron cuando se observaron que agonizaban. En un experimento subsiguiente, a todos los ratones supervivientes se les inoculó, cuatro semanas más tarde, una dosis de 100 DL₅₀ de virus PR8 de tipo natural. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las directrices del NIH sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2 Resultados: atenuación del virus de la gripe A por deleciones en NS1

Los solicitantes han mostrado anteriormente que un virus de la gripe A en el que se suprimió el gen NS1 (virus delNS1) es capaz de crecer hasta títulos de aproximadamente 10^7 UFP/ml en células deficientes en la producción de interferón (IFN) de tipo I, tal como células Vero. Sin embargo, en este virus disminuyó su capacidad para replicarse y provocar enfermedades en ratones (García-Sastre et al., 1998, *Virology* 252:324). Al contrario, el virus delNS1 podía crecer y provocar la muerte a ratones STAT1^{-/-}. Estos resultados demostraron que la proteína NS1 del virus de la gripe A es un factor de virulencia implicado en la inhibición de las respuestas antivirales del hospedante mediadas por IFN de tipo I. Se realizaron los siguientes experimentos para determinar si se podría generar virus de la gripe con características de virulencia intermedias entre el virus de tipo natural y el virus delNS1 suprimiendo porciones del gen NS1 y si alguno de estos virus podría tener características óptimas para ser utilizado como vacunas atenuadas vivas contra los virus de la gripe, es decir, estabilidad y un equilibrio apropiado entre atenuación, poder inmunógeno y crecimiento en sustratos adecuados para la preparación de vacunas, tales como huevos de pollo embrionados.

Con el fin de analizar esta hipótesis, se generó un virus de la gripe A/PR/8/34 (PR8) en el que se había modificado el gen NS1 con el fin de dirigir la expresión de una proteína NS1 truncada que sólo contuviera 99 aminoácidos en el amino terminal en común con los 230 aminoácidos de la proteína NS1 de tipo natural. Este virus (NS1-99) se obtuvo por transfección de RNP de un gen NS modificado por ingeniería genética de modo artificial usando el virus auxiliar 25A-1, como había sido descrito anteriormente (García-Sastre et al., 1998, *Virology* 252:324). El análisis de la expresión de NS1 en células infectadas por virus reveló la naturaleza truncada de la proteína NS1 del virus NS1-99.

Se analizó la capacidad de los virus delNS1, NS1-99 y PR8 de tipo natural para crecer en huevos de pollo embrionados de diferentes días. La justificación de este experimento procede de que la capacidad de los huevos embrionados para sintetizar y responder al IFN de tipo I bajo un estímulo apropiado depende de la edad. En efecto, tanto la inducibilidad como la sensibilidad al IFN comienzan a una edad de aproximadamente 10 días y a continuación aumentan exponencialmente con la edad (Sekellick et al., 1990, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26:997; Sekellick & Marcus, 1985 *J. Interferon Res.* 5:657). Por consiguiente, el uso de huevos de diferentes edades representa un sistema único para analizar la capacidad de diferentes virus de inhibir respuestas al IFN. Se inocularon huevos de 6, 10 y 14 días con aproximadamente 10^3 UFP de virus PR8, NS1-99 o delNS1, se incubaron a 37°C durante 2 días y los virus presentes en el líquido alantoideo se titularon mediante valoración por hemaglutinación (HA). Como se muestra en la Tabla 3, mientras el virus de tipo natural creció hasta títulos de HA similares en huevos embrionados de 6, 10 y 14 días, delNS1 sólo se replicó hasta un título de HA detectable en huevos de 6 días. Al contrario, el virus NS1-99 mostró un comportamiento intermedio entre los virus delNS1 y de tipo natural y pudo desarrollarse hasta títulos de HA similares a los del virus de tipo natural en huevos de 10 días pero no en huevos de 14 días.

Tabla 3: Replicación del virus en huevos de pollo embrionados.

Virus	Edad de los huevos:	Título de hemaglutinación ¹		
		6 días	10 días	14 días
PR8 WT ²		2.048	4.096	1.071
NS1/99		N.D. ³	2.048	<2
delNS1		64	<2	<2

¹ Los títulos representan la mayor dilución con actividad hemaglutinante.

² Virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo natural.

³ No determinado.

A continuación se determinaron en ratones las características de atenuación del virus NS1-99. Con este fin, se infectaron intranasalmente grupos de 5 ratones BALB/c con 5×10^5 UFP, $1,5 \times 10^5$ o $1,5 \times 10^3$ UFP de virus PR8 o NS1-99 de tipo natural. Se vigilaron a continuación los ratones durante 3 semanas para comprobar su supervivencia. Los

resultados se recogen en la Tabla 4. El virus NS1-99 presentaba una DL_{50} al menos tres log mayor que la del virus de tipo natural.

Tabla 4. Atenuación del virus NS1-99 en ratones

Virus	Dosis infectante (UFP):	Supervivientes		
		5×10^6	$1,5 \times 10^5$	5×10^3
PR8 WT ¹		1/5	1/5	1/5
NS1-99		3/5	5/5	5/5

¹ Virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo natural.

7. Ejemplo: generación y caracterización de los mutantes por truncamiento de NS1 en el virus de la gripe B

5 7.1 Materiales y métodos

Los detalles experimentales son similares a los del Apartado 6.1. Se obtuvieron dos virus mutantes de la gripe B, B/610B5B/201 (B/201) y B/AWBY-234, con una longitud de 127 aminoácidos y 90 aminoácidos (proteínas NS1 truncadas en C-terminal), respectivamente (Norton et al., 1987 *Virology* 156:204; Tobita et al., 1990 *Virology* 174:314) por experimentos de co-infección en cultivo tisular que implicaban los virus B/Yamagata/1/73 (B/Yam) y A/Aichi/2/68 en presencia de un anticuerpo anti-virus A (H3N2). El crecimiento de los virus mutantes de la gripe en huevos embrionados de diferentes días se comparó con el del virus parental B/Yam, que posee una proteína NS1 de tipo natural de 281 aminoácidos. Se inocularon huevos de 6, 10 y 14 días con aproximadamente 10^3 UFP de virus B/Yam, B/201 o B/AWBY-234, se incubaron a 35°C durante 2 días y los virus presentes en el líquido alantoideo se titularon mediante una valoración por HA.

Además, se determinaron en ratones las características de atenuación de los virus B/201 y B/AWBY-234. Grupos de tres ratones BALB/c se infectaron intranasalmente con 3×10^5 UFP de virus B/YAM o B/201 de tipo natural y de virus mutante B/AWBY/234 y se determinó la capacidad de estos virus para replicarse midiendo los títulos virales en pulmones 3 días después de la infección, puesto que el virus B/Yam de tipo natural no induce signos patógenos evidentes en ratones.

20 7.2 Resultados

Tabla 5: Replicación del virus de la gripe B en huevos de pollo embrionados.

Virus	Edad de los huevos:	Título de hemaglutinación		
		6 días	10 días	14 días
B/Yam		362	256	<2
B/201		32	<2	<2
B/AWBY-234		8	<2	<2

Los resultados del crecimiento de los virus de la gripe B de tipo natural y mutantes en huevos de pollo embrionados, recogidos en la Tabla 5, demuestran que, como en el caso de los virus de la gripe A, un truncamiento en el carboxi-terminal del NS1 del virus de la gripe B es responsable de una menor replicación en huevos de pollo embrionados de más días lo que provoca una respuesta eficaz al IFN. Este hallazgo indica que el NS1 del virus de la gripe B está también implicado en la inhibición de la respuesta al IFN del hospedante y que las deleciones en el gen NS1 del virus de la gripe B dan como resultado un fenotipo atenuado.

Los resultados de los experimentos de replicación en ratones se recogen en la Tabla 6. Los títulos de los virus B/201 y B/AWBY-234 tenían aproximadamente una magnitud tres log inferior a la de los títulos del virus B/Yam, lo que indica que los truncamientos del dominio del carboxi-terminal del NS1 del virus de la gripe B son responsables de un fenotipo atenuado en ratones.

Tabla 6. Replicación del virus de la gripe B en pulmones de ratones

<u>Virus</u>	<u>Títulos en el pulmón 3 días después de la infección (UFP/pulmón)</u>		
B/Yam	2x10 ⁴	1x10 ⁴	3x10 ⁴
B/201	30	<10	60
B/AWBY-234	<10	40	<10

8. Protección frente a la infección por el virus de la gripe de tipo natural en ratones inmunizados con virus de la gripe A y B que contienen delecciones en sus proteínas NS1

5 Con el fin de determinar si ratones inmunizados con virus atenuados de la gripe A and B que contenían proteínas NS1 truncadas estaban protegidos frente a la inoculación con sus respectivos virus de tipo natural se realizó el siguiente experimento. Ratones BALB/c se inmunizaron intranasalmente con virus A/NS1-99 y tres semanas más tarde se infectaron con 100 DL₅₀ del virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo natural. Los animales inmunizados no murieron mientras que todos los ratones de control sin tratamiento previo murieron después de la inoculación (véase la Tabla 7). En un segundo experimento, ratones BALB/c fueron inmunizados intranasalmente con los virus de la gripe B, B/201 o B/AWBY-234, que expresan proteínas NS1 truncadas. Tres semanas más tarde se inocularon los ratones con 3x10⁵ UFP del virus de la gripe B/Yam/1/73 de tipo natural. Puesto que esta cepa del virus de la gripe B no induce síntomas patógenos en ratones, se determinó el grado de protección midiendo los títulos de los virus en los pulmones 3 días después de la inoculación. Mientras que los animales de control sin tratamiento previo tenían títulos de alrededor de 10⁴ UFP/pulmón, no se detectaron virus en pulmones de animales inmunizados (véase la Tabla 8).
 10 Estos hallazgos sugieren que los virus de la gripe A así como los de la gripe B que contienen genes NS1 modificados son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en ratones que los protege totalmente de una inoculación de virus de tipo natural posterior.
 15

Tabla 7. Supervivencia de ratones inmunizados con el virus de la gripe A/NS1-99 después de inoculación con 100 DL₅₀ del virus de la gripe A/PR/8/34 de tipo natural.

<u>Dosis inmunizante del virus A/NS1-99</u>	<u>Número de supervivientes /Número total</u>
5x10 ⁶ UFP	3/3
1,5x10 ⁵ UFP	4/4
PBS	0/5

20 **Tabla 8. Títulos en el pulmón de ratones inmunizados con los virus de la gripe B/201 y B/AWBY-234 después de inoculación con 3x10⁵ UFP del virus de la gripe B/Yamagata/73 de tipo natural.**

<u>Dosis inmunizante</u>	<u>Títulos en el pulmón (UFP/pulmón)</u>
3X10 ⁵ UFP de B/201	<10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹
3X10 ⁵ UFP de B/AWBY-234	<10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹ , <10 ¹
PBS	2,5x10 ⁴ , 1x10 ⁴ , 1,7x10 ⁴ , 3x10 ⁴ , 5x10 ⁴

9. Ejemplo: inducción de interferón de tipo I en huevos embrionados infectados con virus delNS1

25 A continuación se determinó la capacidad del virus delNS1, un virus de la gripe A que carece del gen NS1, para inducir la secreción del IFN de tipo I en huevos de pollo embrionados. Con este fin, se infectaron grupos de dos huevos de pollo embrionados de 10 días con 5x10³ UFP de virus delNS1 o PR8 de tipo natural. Dieciocho horas después de incubación a 37°C, se recogió el líquido alantoideo y se dializó frente a una solución de pH ácido durante una noche, para inactivar los virus infecciosos. Después de tratamiento a pH ácido, se dializaron las muestras frente a PBS y se analizó su actividad del IFN determinando la mayor dilución con actividad protectora contra una infección por VSV (aproximadamente 200 UFP) en células CEF. Los resultados recogidos en la Tabla 9 indican que
 30 en ausencia de NS1, los virus de la gripe A son mayores inductores del IFN.

Tabla 9. Inducción del IFN en huevos.

<u>Virus</u>	<u>IFN (U/ml)</u>
PR8	<16, <16
delNS1	400, 400
Sin virus	<16, <16

10. Ejemplo: actividad antiviral del virus delNS1

La eliminación del gen antagonista del IFN (NS1) del virus de la gripe A puede dar como resultado un virus con la capacidad para inducir altos niveles de IFN. Si este es el caso, el virus delNS1 "interferirá" con la replicación de los virus sensibles al IFN. Con el fin de analizar esta posibilidad, los solicitantes investigaron la capacidad del virus delNS1 para inhibir la replicación en huevos del virus de la gripe A/WSN/33 (WSN), una cepa del virus de la gripe usada normalmente en el laboratorio. Como puede observarse en la Figura 1, el tratamiento con solamente 2 UFP del virus delNS1 era capaz de reducir en el líquido alantoideo en un log los títulos finales del virus WSN. Además, el tratamiento con 2×10^4 UFP del virus delNS1 dio como resultado la anulación prácticamente completa de la replicación de WSN en huevos. El virus delNS1 también era capaz de interferir con la replicación en huevos de otras cepas de virus de la gripe A (H1N1 y H3N2), virus de la gripe B y un virus diferente, tal como el virus de Sendai (Figura 2).

Animados por estos resultados, los solicitantes determinaron entonces la capacidad del virus delNS1 para interferir con la replicación en ratones del virus de la gripe de tipo natural. Aunque el tratamiento con IFN de tipo I en cultivos tisulares evita la replicación *in vitro* del virus de la gripe A, el tratamiento de ratones con IFN no es capaz de inhibir la replicación de los virus de la gripe (Haller, 1981, *Current Top Microbiol Immunol* 92:25-52). Esto se cumple en la mayoría de las cepas endogámicas de ratones, excepto en los ratones A2G. Los ratones A2G, así como una proporción significativa de ratones de tipo natural (aproximadamente 75%), contienen al menos un alelo Mx1 intacto, mientras que la mayoría de las cepas usadas en los laboratorios son Mx1 -/- (Haller, 1986, *Current Top Microbiol Immunol* 127:331-337). La proteína Mx1, que es homóloga a la proteína MxA humana (Aebi, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 11:5062), es un potente inhibidor de la replicación de los virus de la gripe (Haller, 1980, *Nature* 283:660). Esta proteína no se expresa constitutivamente, pero su expresión es inducida transcripcionalmente por IFN de tipo I. Por consiguiente, los ratones A2G se pueden utilizar para analizar la capacidad de inductores de IFN para estimular una respuesta antiviral frente a los virus de la gripe A (Haller, 1981, *Current Top Microbiol Immunol* 92:25-52).

Los solicitantes infectaron intranasalmente ocho ratones A2G de 4 semanas con 5×10^6 UFP de un aislado del virus de la gripe A/PR/8/34 altamente patógeno (Haller, 1981, *Current Top Microbiol Immunol* 92:25-52). La mitad de los ratones recibieron un tratamiento intranasal con 5×10^6 UFP de delNS1, 24 horas antes que la infección con PR8. Los otros cuatro ratones fueron tratados con PBS. Se vigilaron los cambios de peso y la supervivencia. Estos resultados demuestran que el tratamiento con delNS1 era capaz de proteger a los ratones A2G frente a la muerte inducida por los virus de la gripe y de la pérdida de peso. El mismo tratamiento no fue eficaz en ratones Mx1 -/-, lo que indicaba que el mecanismo de protección viral era mediado en Mx1, es decir, por IFN.

11. Ejemplo: propiedades antitumorales del virus delNS1 en ratones

Dado que el IFN de tipo I y/o los inductores del IFN de tipo I han demostrado que tienen actividades antitumorales (Belardelli and Gresser, 1996 *Immunology Today* 17: 369-372; Qin et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 14411-14416), es posible que el tratamiento de tumores con el virus delNS1 pudiera mediar la regresión de tumores. Alternativamente, el virus delNS1 podría tener propiedades oncolíticas, es decir, puede ser capaz de crecer específicamente en células tumorales y matarlas, muchas de las cuales se sabe que tienen deficiencias en el sistema del IFN. Con el fin de analizar la actividad antitumoral del virus delNS1, se realizó el siguiente experimento usando la línea celular de carcinoma de múridos CT26.WT en un modelo de tumor de ratón para metástasis pulmonar (Restifo et al., 1998, *Virology* 249:89-97). Se inyectaron por vía intravenosa en doce ratones BALB/c de 6 semanas 5×10^5 células CT26.WT. La mitad de los ratones se trataron intranasalmente con 10^6 UFP del virus delNS1 cada 24 horas 1, 2 y 3 días después de la inoculación. Doce días después de la inyección del tumor, se sacrificaron los ratones y se enumeraron las metástasis pulmonares. Como se muestra en la Tabla 10, el tratamiento con delNS1 produjo una regresión significativa de las metástasis pulmonares en múridos.

Tabla 10. Actividad antitumoral del virus delNS1 en ratones BALB/c inyectados con las células tumorales CT26.WT.

	<u>Número de metástasis pulmonares</u>	
	<u>Tratados con PBS</u>	<u>Tratados con delNS1</u>
Ratón 1	>250	120
Ratón 2	>250	28
Ratón 3	>250	9
Ratón 4	>250	6
Ratón 5	>250	2
Ratón 6	>250	1

12. Ejemplo: la proteína NS1 inhibe la translocación del IRF-3 durante la infección con el virus de la gripe

5 Los resultados descritos en la presente memoria sugieren que la proteína NS1 del virus de la gripe es responsable de la inhibición de la respuesta al IFN de tipo I contra el virus y que las mutaciones/delecciones en esta proteína dan como resultado virus atenuados debido a una mejor respuesta al IFN durante la infección. Se sabe que la síntesis del IFN de tipo I durante la infección viral puede ser provocada por el RNA bicatenario (dsRNA). El IRF-3 es un factor de transcripción que se encuentra generalmente en forma inactiva en el citoplasma de células de mamíferos. El RNA bicatenario induce la fosforilación (activación) del factor de transcripción IRF-3, dando como resultado su translocación al núcleo, donde induce la transcripción de genes específicos, incluyendo los genes que codifican el IFN de tipo I (Weaver et al., 1998, *Mol. Cell. Biol.* 18:1359). Con el fin de determinar si el NS1 del virus de la gripe está actuando sobre el IRF-3, se vigiló la localización del IRF-3 en las células CV1 infectadas con el virus PR8 de tipo natural o con el virus delNS1 de la gripe A. La Figura 3 muestra que la translocación de IRF-3 es mínima en las células infectadas con PR8 (menos del 10% de las células). Por el contrario, aproximadamente el 90% de las células infectadas con delNS1 mostraron localización nuclear de IRF-3. Sorprendentemente, fue posible inhibir parcialmente la translocación del IRF-3 en las células infectadas por delNS1 mediante la expresión de NS1 en un plásmido en trans. Los resultados demuestran que el NS1 del virus de la gripe A es capaz de inhibir la translocación del IRF-3 en células infectadas por el virus. Es probable que el NS1 del virus de la gripe evite la activación mediada por el dsRNA del IRF-3 secuestrando el dsRNA generado durante la infección viral, dando así como resultado una inhibición de la síntesis del IFN.

10

15

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética, cuyo genoma: (i) comprende una secuencia heteróloga, que codifica para un segmento de gen de virus de la gripe, y (ii) codifica una proteína NS1 truncada que consiste en 99 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 de una cepa de virus de la gripe, donde el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética tiene un fenotipo antagonista del interferón dañado.
2. El virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la reivindicación 1, donde dicho segmento de gen de virus de la gripe es el segmento de gen de hemaglutinina o neuraminidasa.
- 10 3. El virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la reivindicación 1 o 2, donde el virus de la gripe atenuado es un virus de la gripe A.
4. El virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de la reivindicación 1 o 2, donde el virus de la gripe atenuado es un virus de la gripe B.
5. Una formulación de vacuna que comprende el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende el virus de la gripe quimérico atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una formulación de vacuna que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un excipiente aceptable fisiológicamente, para usar en un método para prevenir una enfermedad infecciosa sensible al interferón en un sujeto.
- 20 8. Una formulación de vacuna que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un excipiente aceptable fisiológicamente, para usar en un método para provocar una respuesta inmune en un sujeto.
9. La formulación de vacuna para uso de la reivindicación 7, donde la enfermedad infecciosa sensible al interferón está causada por una infección de virus de la gripe.
- 25 10. Una composición farmacéutica que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para tratar tumores o prevenir la formación de tumores en un sujeto.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para prevenir o tratar un enfermedad infecciosa sensible al interferón en un sujeto.
12. Una composición farmacéutica que comprende el virus de la gripe atenuado modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto.
- 35 13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 11, donde la enfermedad infecciosa sensible al interferón es una infección viral.
14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 13, donde la infección viral es una infección del virus de la gripe.

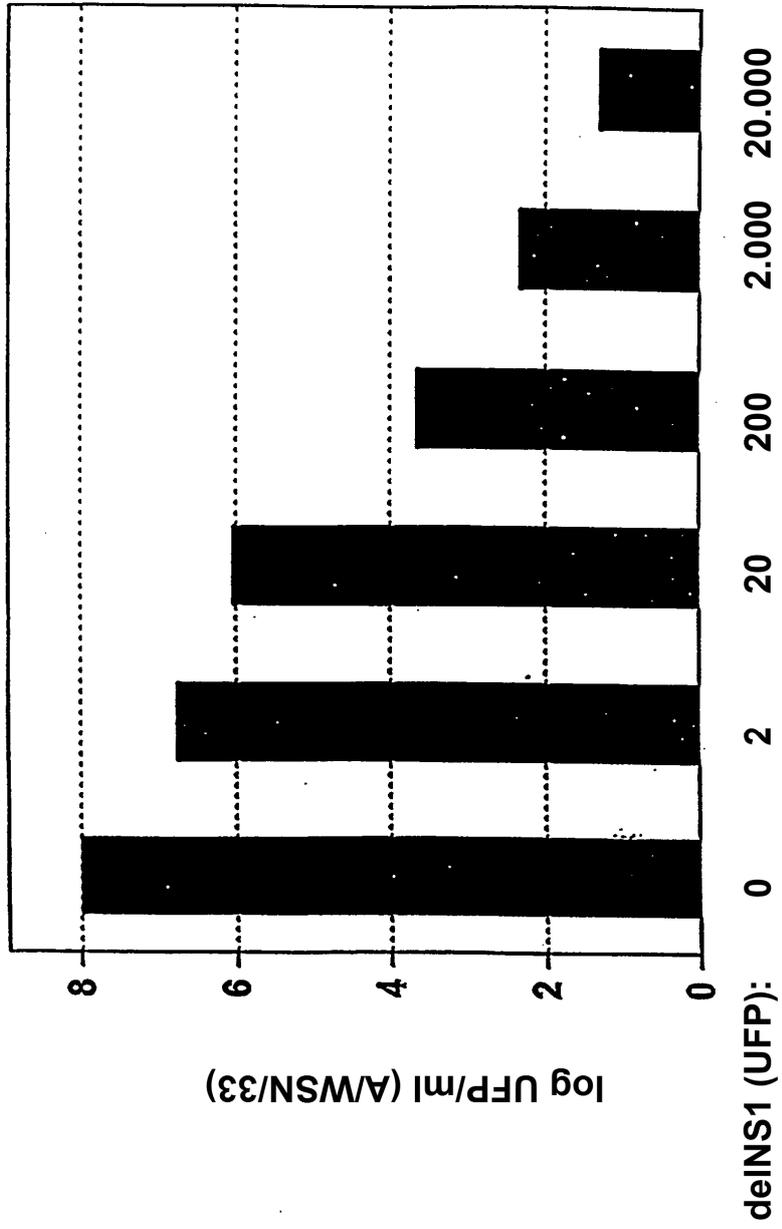


FIG. 1

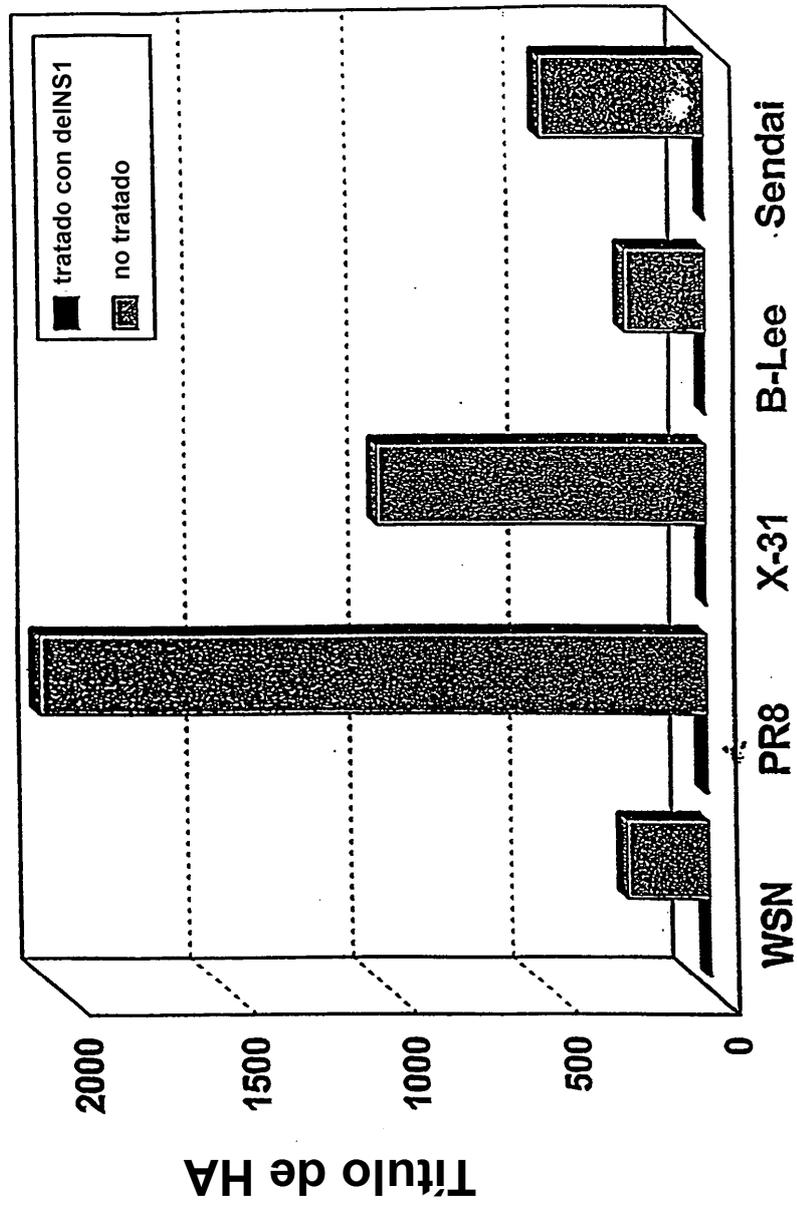
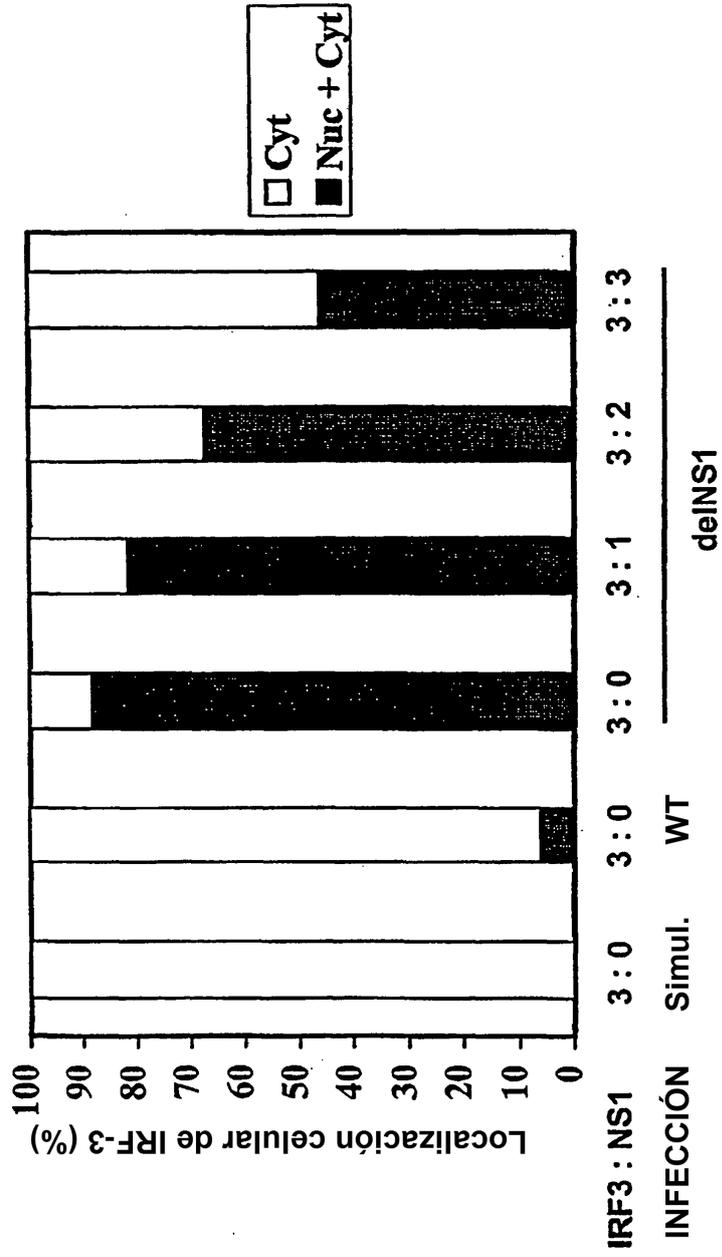


FIG. 2



Simul. = simulada
 WT = con virus de tipo natural

FIG. 3